

ПРАВИТЕЛЬСТВО РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
(СПбГУ)

Кафедра молекулярной биофизики и физики полимеров  
Направление «Физика»



***ИССЛЕДОВАНИЯ НИЗКОЧАСТОТНОЙ ДИНАМИКИ  
БИОПОЛИМЕРОВ В ОКРЕСТНОСТИ ТЕПЛОВОЙ  
ДЕНАТУРАЦИИ***

Выпускная квалификационная работа аспиранта

\_\_\_\_\_ **Дмитриева Артема Владимировича**

Научный руководитель:

\_\_\_\_\_ д. ф.-м. н., проф. **Трусов А.А.**

Рецензент:

\_\_\_\_\_ д. ф.-м. н., проф. **Орлов Ю.Н.**

Санкт-Петербург  
2016

## **Содержание**

<b>Введение .....</b>	<b>4</b>
<b>1.Обзор литературы .....</b>	<b>7</b>
1.1 Уровни организации белков .....	7
1.1.1 Полипептидная цепь. Первичная структура белков.....	8
1.1.2 Конформации полипептидной цепи. Вторичная структура белков .....	11
1.1.3 Третичная структура белков. Белковая глобула и гидрофобные взаимодействия.....	13
1.1.4 Связь между первичной и пространственной структурами белков .....	15
1.1.5 Методы определения структуры белков.....	17
1.1.6 Современная классификация белков .....	24
1.2 Тепловая денатурация белков .....	26
1.3 Колебательный спектр биополимеров .....	29
<b>2.Материалы и методы .....</b>	<b>37</b>
2.1 Материалы .....	37
2.2 Оборудование .....	37
2.3 Приготовление растворов.....	38
2.4 Установка МБР .....	38
<b>3.Экспериментальные результаты и обсуждение.....</b>	<b>43</b>

3.1 Влияние кислотности на динамику фазовых превращений в лизозиме.....	43
3.2 Низкочастотная динамика БСА в дейтерированом PBS буфере.....	54
<b>Заключение.....</b>	<b>62</b>
<b>Благодарности.....</b>	<b>64</b>
<b>Список литературы .....</b>	<b>65</b>

## Введение

Изучение фазовых превращений является сейчас одним из самых актуальных направлений в физике конденсированных сред. Начиная с 40-х годов прошлого века экспериментаторы получили важные инструменты для этих исследований: последовательно, была предложена теория структурных фазовых переходов второго рода, развита концепция мягкой моды, теория критических явлений для фазовых переходов первого рода и т.д. Сейчас, с помощью модельных и *ab initia* расчетов оказалось возможным проводить моделирование динамики кристаллической решетки для даже для соединений низкой симметрией. Экспериментальные и теоретические работы в физике конденсированных сред прошли этапы изучения фазовых переходов в частично разупорядоченных кристаллах (например, сильно дефектные соединения) и, окончательно, к фазовым превращениям в сложных органических структурах, таких как биополимеры. Изменения в структуре, а следовательно и в динамике таких объектов, как белки и ДНК, непосредственно связаны с их биологической активностью и функциями. Сейчас уже твердо установлено, что ряд болезней, таких как нейродегенеративные, прионные и др. связаны с изменениями в пространственной организации белков, ДНК. Это обусловило актуальности исследования фазовых превращений в биополимерах, которые позволяют понять механизм их активности. При этом оказывается продуктивным применение всего накопившегося в физике твердого тела инструментария как экспериментального, так и теоретического. Это позволяет переосмыслить все результаты в рамках сложившихся к настоящему времени физических представлений. Здесь принципиально новыми становятся исследования динамики фазовых превращений в биополимерах, поскольку именно динамические процессы на частотах от 1 до 1000 ГГц обычно связаны с локальными конформационными изменениями, т.е. с прыжками групп атомов от одной конфигурации к другой, и с другими коллективными

возбуждениями. Таким образом, в длинноволновом приближении исследования релаксационных и фононных подсистем с помощью мандельштам-бриллюэновского рассеяния (МБР) света является удобным и информативным методом изучения динамики фазовых превращений в биополимерах. Характерным примером фазовых превращений в белках является денатурация, т.е. утрата нативного состояния молекулы белка при воздействии на него таких факторов как температура, давление и пр. Исследования пептидов [1], лизоцима [2-4], коротких фрагментов ДНК [5] с помощью МБР света показали, что низкочастотная динамика биополимеров отражает не только всю полноту фазовых превращений, но и содержит информацию о таких превращениях как агрегация, гелеобразование и пр. Анализ данных, полученных как с помощью МБР света, так и такими комплементарными методами исследований как неупругое или квазиупругое рассеяние нейтронов, диэлектрическая спектроскопия и пр., позволяет восстановить общую картину динамики фазовых превращений, поскольку она сильно связана с "пробной" частотой эксперимента.

Здесь необходимо отметить, что вопрос о связи динамики и структуры белков тесно связан с вопросом структурной классификации белков, которая начала формироваться только в последнее десятилетие [6,7]. Поэтому систематическое изучение динамики белков, относящихся к различным типам пространственной организации, является принципиально новым подходом, который в данный момент только начинает развиваться. Результаты, полученные в ходе экспериментов по МБР света, позволяют проанализировать влияния структурных особенностей биополимеров на динамику фазовых превращений. С этой целью мы выбрали в качестве объектов исследований лизоцим и бычий сывороточный альбумин, пространственная организация которых существенно различается, а динамика тепловой денатурации существенно зависит как от кислотности, так и от изотопического замещения водорода на дейтерий. Целью данной

работы было исследование поведения низкочастотной области колебательного спектра лизоцима и БСА при тепловой денатурации методом МБР света и связать его со структурными изменениями в рассматриваемых белках.

# Глава 1

## Обзор литературы

### 1.1 Уровни организации белков

«Жизнь есть способ существования белковых тел, существенным моментом которого является постоянный обмен веществ с окружающей их внешней природой, причем с прекращением этого обмена веществ прекращается и жизнь, что приводит к разложению белка», Фридрих Энгельс. Белки – высокомолекулярные органические вещества, биополимер, состоящий из аминокислот, соединенных между собой пептидной связью. Белки выполняют широкий набор функций, играющих важную роль в процессах жизнедеятельности. Например, белки-*ферменты* являются катализаторами для всех химических, электрохимических и механических процессов. На первое место можно поставить именно ферментативную функцию. Специальные ферменты служат катализаторами всех метаболических реакций, репликации, транскрипции и трансляции ДНК. Некоторые белки, выполняют структурную функцию, поддерживая форму клеток. Особые сократительные белки участвуют в движении клеток и организмов, позволяя совершать механическую работу. Сократительные белки являются ферментативными белками, позволяющие переводить химическую энергию, накопленную в АТФ в механическую работу, путем окислительного фосфорилирования. Белки катализируют и окислительно-восстановительные реакции при фотосинтезе. Мембранные белки ответственны за активный транспорт молекул и ионов через клеточную мембрану, и, как следствие, за распространение нервного импульса. Все метаболические и биоэнергетические процессы так или иначе связаны с белками. Такие белки как миоглобин, гемоглобин, гемоцианин участвуют в транспорте кислорода в организме. Даже низкомолекулярные белки выполняют ряд жизненно важных функций, например, полипептиды являются гормонами, стимулируя определенные клетки. Белки выполняют и

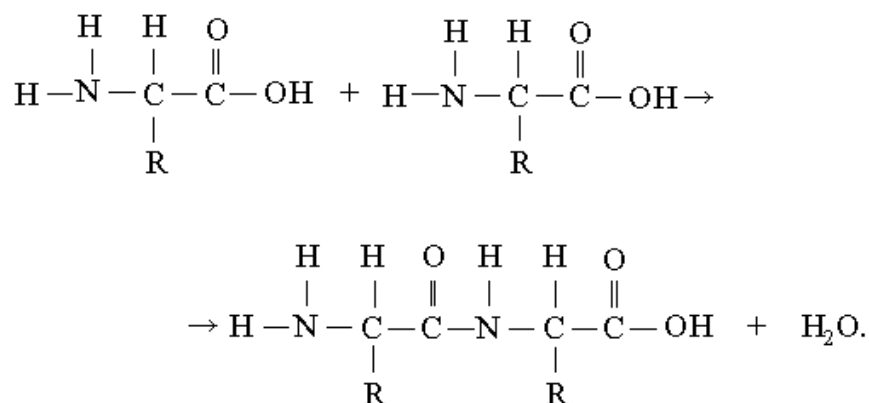
защитную функцию, функционируя в качестве антител в иммунных процессах. Наконец, белки выполняют опорную функцию, обеспечивая подвижную взаимосвязь органов, целостность организма и защиту от внешних воздействий.

Молекулы белков - сложные системы, пространственная структура которых определяется не только химическими связями в белковых цепях, но и рядом слабых взаимодействий, таких как водородные, электростатические, гидрофобные. Следствием существования этих взаимодействий можно считать то, что нативные или, другими словами, биологически активные белки не могут являться статистическими клубками. Чаще всего они находятся в состоянии компактной структуры – глобулы. Глобула в некотором приближении является аperiодическим кристаллом сложной структуры. Кроме глобулярных белков существуют так же и фибриллярные белки, выполняющие сократительную и опорную функции. Еще раз отметим, что белки это не статистические системы, а динамические, поведение которых зависит от расположения и свойств внутренних элементов. Это означает, что знание структуры белков, может оказаться необходимым, но недостаточным условием для объяснения их свойств, т.е. в дополнении к структуре необходимо исследовать динамическое поведение белковых молекул.

#### *1.1.1 Полипептидная цепь. Первичная структура белков.*

Все белки образованы из 20 типов аминокислотных остатков. Образование белковой или полипептидной цепи происходит путем поликонденсации аминокислот, где аминогруппа одной аминокислоты соединяется с карбоксильной группой другой с выделением воды и с образованием пептидной связи  $\text{—NH—CO—}$  (рисунок 1.1).





*Рисунок 1.1. Поликонденсация аминокислот*

Белковые макромолекулы могут состоять из одной или нескольких полипептидных цепей. Полипептидная цепь – несимметричная, на одном N-конце находится NH<sub>2</sub>-группа, на другом, С-конце – группа COOH. В среднем, молекулярная масса полипептидной цепи равна 20000, что соответствует 150-180 остаткам. Молекулы, содержащие меньше 100 аминокислотных остатков, принято называть полипептидами. Таковы некоторые гормоны.

Как было установлено методом рентгеноструктурного анализа [8-16], пептидная связь –NH–CO– имеет плоское строение, все четыре атома, лежат в одной плоскости, как показано на рисунке 1.2. Стоит отметить, что связь С–N укорочена в сравнении со связью в алифатических аминах. Это связано с сопряжением связей С=О и С–N и перекрывании их электронных оболочек, что сопровождается сдвигом электронной плотности. Связь С=О не является полностью двойной, а связь С–N – единичной, в реальности наличествует близкая к полуторной связь. В остоле полипептидной цепи чередуются жесткие структуры (плоские пептидные группы) с относительно подвижными участками (—CHR), которые способны вращаться вокруг связей. Такие особенности строения полипептидной цепи влияют на укладку ее в пространстве.

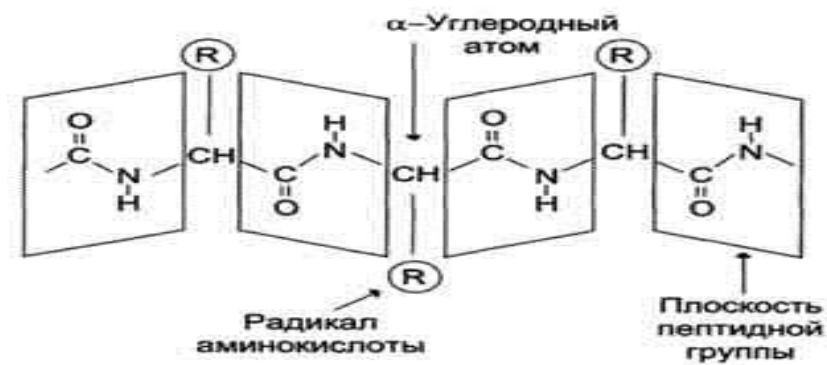


Рисунок 1.2. Изображение планарной структуры пептидной связи.

Последовательность аминокислотных остатков в белковой цепи называется ее первичной структурой. Первичная структура - простейший уровень структурной организации белковой молекулы, своего рода текст, написанный 20 буквенным алфавитом. Первичной структурой определяется биологическое функционирование белка. Сопоставление гомологичных белков различных видов со схожими функциями, позволяет рассмотреть эволюцию. Мутации в замещение аминокислотных остатков увеличиваются с увеличением расстояния между видами на эволюционной лестнице. Сопоставление первичной структуры универсального белка дыхательной цепи цитохром-с позволило построить эволюционное дерево (Рисунок 1.3).



Рисунок 1.3. Эволюционное дерево, построенное на основе аминокислотного состава цитохрома-с.

### 1.1.2 Конформации полипептидной цепи. Вторичная структура белков

Для понимания структуры белковых макромолекул, рассмотрим возможные конформации полипептидной цепи. Пространственное расположение атомов в полипептидной цепи будет определяться планарным строением пептидной связи. Из результатов по рентгеноструктурному анализу пептидов и родственных им соединений, следует, что полностью вытянутая цепь имеет *транс*-конформацию по отношению к C-N связи. Способность к образованию водородных связей между атомами Н амидных групп и атомами О карбонильных групп, как показано на рисунке 1.4. Нахождение наиболее устойчивой конформации, требует минимизации полной энергии, включая внутримолекулярные водородные связи.

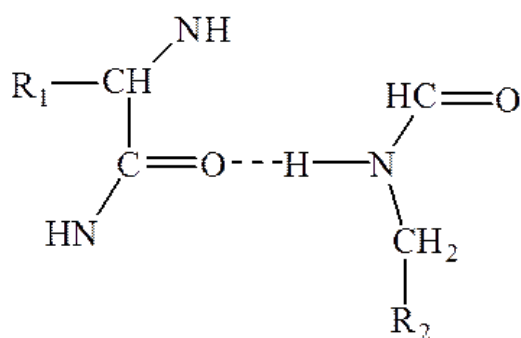


Рисунок 1.4. Водородная связь между карбонильными и амидными группами полипептидной цепи.

Полинг и Кори [8-16] на основании результатов рентгеноструктурного анализа и рассмотрении плотной упаковки с максимальным числом водородных связей определили наиболее устойчивые конформации полипептидной цепи. Существует три такие конформации. Во-первых, *α-спираль*, показанная на рисунке 1.5. Спираль характеризуется поворотом вокруг оси на 100 и перемещением вдоль оси на 0,15нм на каждое пептидное звено. На один полный виток спирали приходится 3,6 пептидной единицы и смещение вдоль оси на 0,54нм. Водородные связи образованы между C=O данной единицы и N-H-группы предшествующей. Такие связи реализуются между всеми аминокислотными остатками, исключение составляет пролил,

который не содержит N-H-группу.  $\alpha$ -спираль может быть как право-, так и левозакрученной. Такая конформация определяется планарным строением пептидной связи.

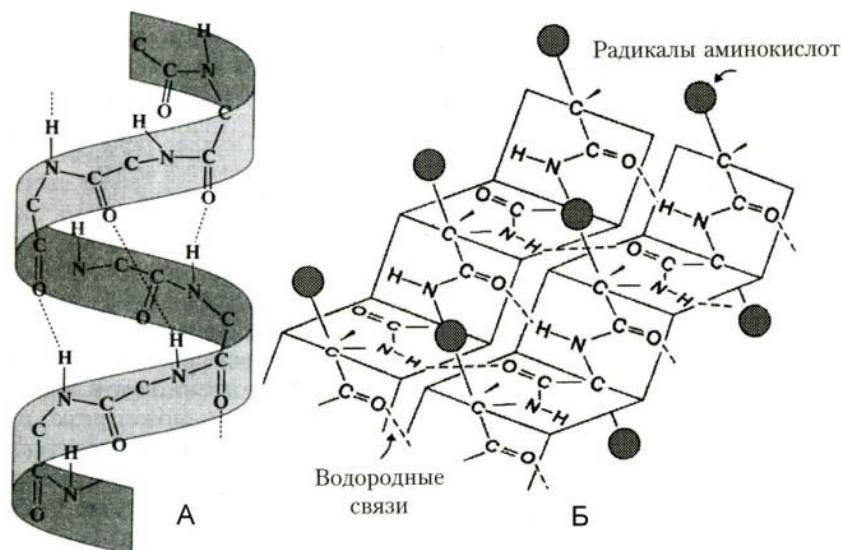


Рисунок 1.5. Конформации полипептидной цепи. А -  $\alpha$ -спираль, Б -  $\beta$ -форма.

Вторая и третья конформации это *параллельная* и *антипараллельная  $\beta$ -формы*, с максимальным насыщением водородных связей, показаны на рисунке 1.5.  $\beta$ -формы или  $\beta$ -слои формируются с помощью межпептидных водородных связей в пределах отдельных участков одной полипептидной цепи, в результате ее систематических изгибов или смежных полипептидных цепей, которые образуют слоистую структуру, в отличие от конформации  $\alpha$ -спирали полипептидной цепи. Цепи в  $\beta$ -форме не имеют плоского, транс-строения, образуется фигура, напоминающая лист, сложенный гармошкой.

Таким образом, именно водородные связи стабилизируют вторичную структуру белковых молекул в растворе. Периодичность вторичной структуры позволяет провести аналогию с кристаллическими структурами,  $\alpha$ -спираль подобна одномерному,  $\beta$ -форма – двумерному кристаллу.  $\alpha$ - и  $\beta$ -формы не единственные возможные, к примеру, фибриллярные белки обладают другим набором конформаций.

### *1.1.3 Третичная структура белков. Белковая глобула и гидрофобные взаимодействия.*

Белковые молекулы могут содержать аминокислотные остатки, которые не могут образовывать водородные связи. Вторичные структуры, упорядоченные участки –  $\alpha$  и  $\beta$ -формы – перемежаются с неупорядоченными участками, в которой полипептидная цепь обладает значительной гибкостью. Как результат, белковая молекула может сворачиваться в компактную структуру, приобретая определенную пространственную, третичную, структуру – глобулу. Именно эта структура биологически функциональна. В ряде случаев, белок обладает четвертичной структурой – белковая система состоит из нескольких глобул. Примерами могут служить молекула гемоглобина, состоящая из 4 глобул двух сортов, вирус табачной мозаики – 2000 идентичных глобул.

Белки это многоуровневая система, где характер структуры на каждом уровне зависит от геометрических свойств предыдущего уровня организации, сил взаимодействия между элементами одного уровня и внешних условий. Белковые молекулы уникальны также и тем, что на высшие уровни организации молекула приходит автоматически, в результате самосборки системы.

В образовании глобулы участвуют разнообразные силы. Единственные сильные взаимодействия в глобуле – это так называемые дисульфидные мостики, Цис-S-S-Цис, наличие сильной ковалентной связи между звеньями, например в молекуле инсулина, ведет к ограничению набора возможных конформаций. Однако это не единственные силы, участвующие в образовании глобулы. В противном случае, все белковые молекулы можно было бы сравнить с цепью каучука в резине, который сохраняет свойства статистического клубка. Глобула сворачивается благодаря существованию слабых взаимодействий – электростатических, ван-дер-ваальсовых, водородных, и, играющих главную роль, гидрофобных.

Белки редко функционируют без водного окружения, которое и определяет высшие уровни организации. При рассмотрении белков влиянием воды нельзя пренебрегать. Очевидно, вода влияет на водородные связи, однако разница в свободной энергии при образовании межмолекулярных водородных связей и таких же связей с молекулами воды минимальна, роль воды в стабилизации третичной структуры иная. Гидрофобный эффект, единственная организующая сила, основанная на отталкивании растворителя. Полярная вода отталкивает неполярные молекулы, в частности углеводороды. Молекулы оба вида групп, как полярные, так и неполярные, располагаются таким образом, что полярные группы контактируют с водой, неполярные – нет. Ленгмюр показал, что именно так построены мономолекулярные слои жирных кислот на поверхности воды, полярные группы – погружены в воду, неполярные – наружу.

В белковой молекуле, среди 20 аминокислот, существуют полярные и неполярные, гидрофильные и гидрофобные. По причине гибкости белковой цепи (наличие неупорядоченных участков), она может сложиться в глобулу и расположить гидрофобные остатки в сердцевине глобулы, а гидрофильные на внешней поверхности. Благодаря наличию гидрофобного ядра, молекулы воды не структурируются при взаимодействии с белками, гидрофильные же остатки имеют характер сольватации.

Деление аминокислотных остатков на две группы: первые – полярные и гидрофильные, вторые – гидрофобные, как это предложил Фишер является достаточно грубым приближением к реальной картине. Фишер получил зависимость формы глобулы по количеству аминокислотных остатков двух групп. При достаточном наличии гидрофильных групп способных полностью закрыть гидрофобные группы, глобула будет иметь форму сферы. Если количество гидрофильных групп больше, то глобула – эллипсоид. В последнем варианте, количество гидрофильных групп недостаточно для покрытия гидрофобных остатков, в этом случае глобулы должны слипаться,

образуя четвертичную структуру. Однако нельзя разделить 20 аминокислот с уникальными свойствами на две группы, следует говорить о степени гидрофобности и ввести его количественную меру. В качестве таковой Танфорд предложил ввести как характеристику изменение свободной энергии радикала аминокислотного остатка при переносе его из эталона в воду. Степени гидрофобности аминокислотных остатков предоставляют информацию о стабильности молекулы, находящейся в водном окружении. Однако нельзя забывать и о том, что некоторые гидрофобные остатки могут находиться и на поверхности глобулы, если в первичной структуре они соседствуют с гидрофильными.

#### *1.1.4 Связь между первичной и пространственной структурами белков*

Строительство молекулярных и надмолекулярных структур состоит из двух этапов: биосинтез соответствующих молекул и самосборка структуры. Оба этапа по своей природе основаны на молекулярном узнавании, за которое ответственны слабые взаимодействия.

При рассмотрении физика белка, вопросы, связанные с самосборкой являются доминантными. Генетическая информация, зашитая в ДНК, используется для биосинтеза, т.е. для формирования первичной структуры. Однако белок в первичной структуре не выполняет своих биологических функций. Биологически активным или нативным состоянием биологической молекулы является третичная или четвертичная структура, получаемая в результате самосборки полипептидной цепи. Поиск соответствий между генетически предопределенной первичной (синтезируемой) и нативной структурой на сегодняшний день остается одним из центральных вопросов в молекулярной биологии, генетике и биофизике.

За доказательством наличия такого соответствия, можно обратиться к работам Анфинсена по ренатурации белков [17]. В отдельных случаях

удавалось проследить восстановление утраченной нативной структуры денатурированного белка.

Рассмотрим иерархию структур белков. Белок состоит из спиральных или вытянутых структурных сегментов, соединенных изгибами и петлями. Элементарные комплексы образуются из нескольких соседних сегментов: шпильки из антипараллельных  $\alpha$ -спиралей, антипараллельные  $\beta$ -шпильки и параллельные  $\beta$ -шпильки, прикрытые  $\alpha$ -спиралью. Далее возникает домен, компактная структура, построенная из нескольких элементарных комплексов и структурных сегментов. Это иерархия, схематически показана на рисунке 1.6. Птицын предположил блочный механизм образования глобулярного белка – более простые структуры являются основой для формирования высших структур.

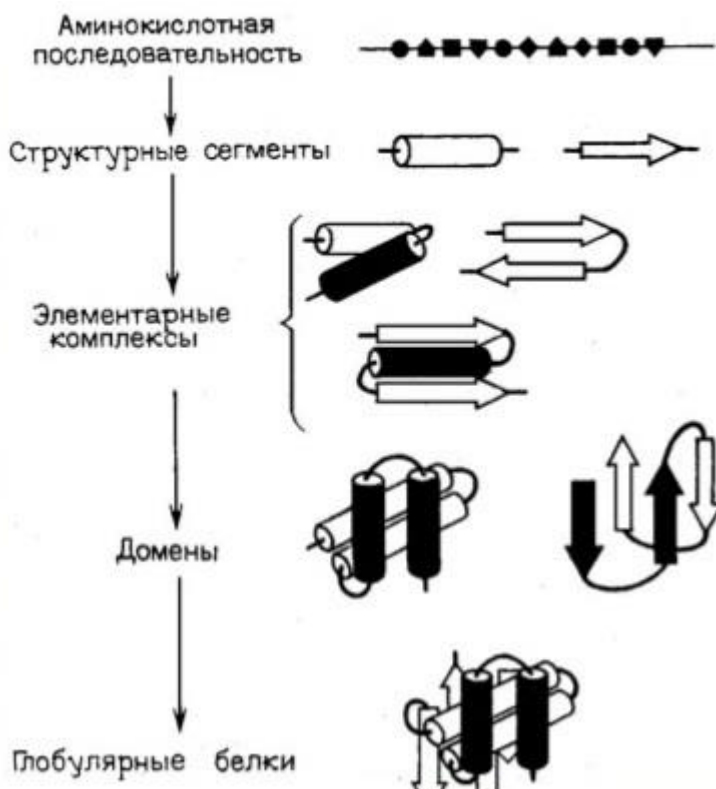


Рисунок 1.6. Иерархия структур белка.

Какими условиями должна отвечать вторичная структура, чтобы служить блоком для образования третичной? Во-первых, формирование вторичной структуры должно идти значительно быстрее, чем третичной. Во-



вторых, время жизни вторичной структуры велико. В-третьих, она должна быть достаточно велика и гидрофобна, для участия в гидрофобных взаимодействиях. Обе  $\alpha$ - и  $\beta$ -структуры удовлетворяют условиям. В своих работах Птицин и Финкельштейн [18-25] развивают математический аппарат, использующий модель Изинга, для расчёта параметров равновесия между различными возможными структурами для всех остатков. Гидрофобные остатки стабилизируют  $\alpha$ - и  $\beta$ -формы, короткие гидрофильные – дестабилизируют. Самосборка может осуществляться двумя способами: формирование плоской  $\beta$ -структуры с дальнейшим налипанием к ней  $\alpha$ -спирали и формирование  $\beta$ -шпильки или пары  $\alpha$ -спиралей с последующим изломом.

При рассмотрении взаимосвязи первичной и пространственной структурами белка можно заметить вырождения, так же в дополнении необходимо рассматривать взаимосвязь пространственной структуры с биологическими функциями, которая так же вырождается. Т.е. белки с разной первичной структурой могут иметь сходной пространственное строение, сходные или различные биологические функции. В качестве примера может выступать семейство белков – глобинов, отвечающих за транспорт и запас кислорода. Первичные структуры глобинов достаточно разные, однако белки имеют схожее пространственное строение.

Эволюция редактирует биологически активную часть белков – активный центр. Активный центр – является частью каркаса, обладающего конформационной подвижностью. Можно предположить, что точная форма каркаса мало влияет на определение биологических функций белка. Многие факты, например вырождение соответствия первичной и пространственной структуры являются вескими свидетельствами в пользу нейтралистской теории молекулярной эволюции, развитой Кимурой [26].

### *1.1.5 Методы определения структуры белков*

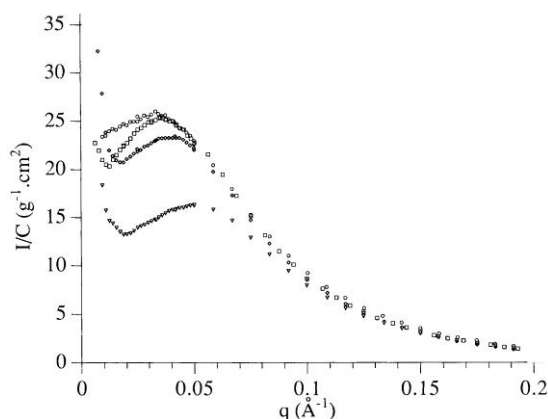
Существует два главных способа изучения строения атомов и молекул: химический и оптический, в широком смысле слова, т.е. изучение взаимодействий вещества со светом в различных диапазонах волн. Химия позволяет определить первичную структуру белков, однако, установить пространственное расположение не может. При изучении белков – главных участников всех биологически важных процессов, особое внимание уделяется исследованию их структуры с помощью методов рентгеновской кристаллографии. Однако использование таких методов тесно сопряжено с получением монокристаллов конкретного белка. В общем случае, белковый кристалл представляет собой совокупность макромолекул, ориентированных определенным образом в пространстве друг относительно друга, в промежутках между которыми находится маточная жидкость. Рентгенографически установлено, что часть молекул воды в кристалле прочно связана с поверхностью белковой молекулы. Если кристалл высушить, то часть воды уходит из кристалла, объем элементарной ячейки уменьшается, кристалл разупорядочивается [27]. В качестве модельного объекта при исследовании процессов роста, а также физических свойств белковых кристаллов, часто используют кристаллы лизоцима.

Помимо рентгеноструктурного анализа белковых кристаллов, существуют и методы, позволяющие изучать структуру белков в растворах. Одним из таких методов является метод рассеяния нейтронов или рентгеновских лучей на малых углах. Малоугловое рассеяние это метод основанный на отклонении излучения от прямой траектории после взаимодействия со структурой большей по размеру чем длинна волны излучения. Как видно из названия, углы отклонения малы ( $0.1-10^\circ$ ). Метод малоуглового рассеяния позволяет определить размеры, форму и ориентацию структур в образце. Метод позволяет работать с крупномасштабными структурами от  $10 \text{ \AA}$  и до  $10^4 \text{ \AA}$ . Важнейшим аспектом этого метода является

возможность изучать внутренние структуры разупорядоченных систем, зачастую метод позволяет получить конкретную структуру системы со случайным расположением неоднородностей плотности в больших масштабах. Существуют два вида малоуглового рассеяния в зависимости от источника излучения: нейтроны и рентгеновские лучи.

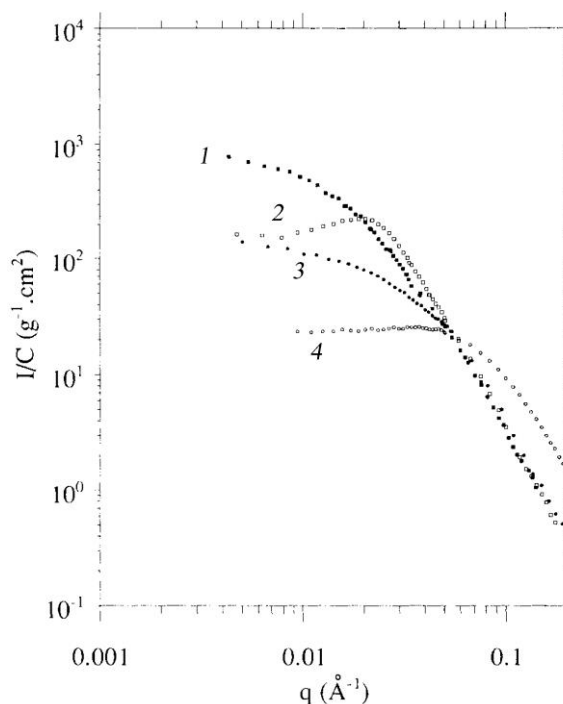
Метод малоуглового рассеяния нейтронов (МРН) широко применяется при исследовании структуры частично упорядоченных сред, таких как полимеры, аэрогели, боратные стекла, и в том числе белковые растворы. Среди многочисленных работ по изучению растворов белков с помощью МРН можно выделить работы, посвященные определению формы и пространственной организации макромолекул в растворе [28], работы по изучению влияния различных факторов, и в первую очередь – изменение ионной силы и pH растворов, на межмолекулярные взаимодействия и образование агрегатов [29-33], а также серию работ по исследованию денатурации белков при нагревании [34] под воздействием мочевины [35], GdnHCl [36-38] и др. и ренатурации [39].

В ходе экспериментов по МРН в растворах белков определяется зависимость интенсивности рассеяния от волнового вектора. Характерный вид этой зависимости представлен на рис. 1.7 для случая рассеяния в растворах  $\beta$ -лактоглобулина с разной концентрацией белка [34]. Хорошо видно, что функция рассеяния имеет ярко выраженный максимум интенсивности рассеяния при  $q \approx 0.02 \text{ \AA}^{-1}$ , наличие которого определяется некоторым упорядочением молекул в растворе, возникающем вследствие определенных межмолекулярных взаимодействий.



*Рис. 1.7: Зависимость интенсивности рассеяния, нормированной к концентрации белка, от волнового вектора для раствора  $\beta$ -лактоглобулина, содержащего 0.03 М натрия хлорид с  $pH=9$ , при различных концентрациях белка: 0.019 (кружки), 0.03 (квадраты), 0.036 (ромбы), 0.097 (треугольники) мг/мл [34]*

Одной из центральных проблем молекулярной биологии является фолдинг белков. Изучение этого процесса предполагает детальное исследование денатурированного и нативного белка, а также фазовых превращений при переходе белка из одного состояния в другое. С помощью МРН исследовалась денатурация и ренатурация таких белков как  $\beta$ -лактоглобулин [34], фосфоглицераткиназа [36, 37], фибронектин [38], лизоцим [39-42] и др. Как известно, к денатурации белков приводят самые различные факторы: нагревание и охлаждение, добавление в раствор сильных кислот или оснований, органических растворителей, детергентов, хаотропных агентов (мочевины и GdnHCl) и др. Изучение с помощью МРН фолдинга крупных белков, таких как фибронектин и фосфоглицераткиназа, после денатурации их GdnHCl или мочевиной позволяет использовать при анализе данных теорию полимеров и определять пространственную организацию белка, будь она довольно компактной глобулярной структурой, гауссовой цепью, или же находящейся в различных промежуточных состояниях [36-38].



*Рис. 1.8: Зависимости интенсивности рассеяния от волнового вектора для нативного (4) и денатурированного нагреванием (1- 3)  $\beta$ -лактоглобулина, 1 – раствор  $\beta$ -лактоглобулина с концентрацией 0,054 g/ml держали в течении 1 часа при 80°C, затем растворили до 0.01 g/ml ,2 - раствор  $\beta$ -лактоглобулина с концентрацией 0,054 g/ml держали в течении 1 часа при 80°C , 3 - раствор  $\beta$ -лактоглобулина с концентрацией 0,01 g/ml держали в течении 1 часа при 80°C [34]*

На рис. 1.8 представлена зависимость интенсивности рассеяния от волнового вектора для раствора нативного  $\beta$ -лактоглобулин и раствора этого белка, нагретого до 80°C [34]. При нагревании белок переходил в денатурированное состояние и агрегировал. Как видно, вид кривой рассеяния в области  $q > 0.04 \text{ \AA}^{-1}$  существенно изменяется при денатурации, что отражает изменение структуры макромолекулы. Различия в области более низких значений  $q$  объясняется образованием агрегатов, состоящих из молекул с конформацией отличной от конформации нативного  $\beta$ -лактоглобулина, и переходом раствора в гель. Система, включающая агрегаты разного размера и, фактически, представляющая собой «сетку», является фрактальным

объектом. Для нагретого раствора  $\beta$ -лактоглобулина определялась фрактальная размерность ( $D_{fr}=1.75$ ) с помощью МРН [34].

Ядерно-магнитный резонанс (ЯМР) - одно из приложений ЯМР-спектроскопии, применяемое для твердого тела и сильно анизотропных систем. Данный метод может использоваться для кристаллических или аморфных твердых веществ, жидких кристаллов, гелей, а также жидкостей. Его главная особенность – не фазовое состояние вещества, а свойства наблюдаемого резонанса.

В жидкостном ЯМР спектр состоит из очень узких линий, которые отвечают анизотропным взаимодействиям, усредненным за счет быстрых неупорядоченных движений молекул в жидкой фазе. ЯМР спектр твердого тела, напротив, представлен широкими линиями, зависящими от ориентации образца во внешнем магнитном поле. Это связано с тем, что в твердом теле взаимодействия ядерных спинов не усреднены и описываются тензором второго ранга. Наличие широких линий в спектре, с одной стороны, является проблемой при его интерпретации, но при сужении линий специальными методами такие спектры несут в себе информацию о химическом составе, структуре и динамике исследуемого вещества.

Подход ЯМР спектроскопии твердого тела успешно применяется для изучения биологических молекул, в том числе белков, с использованием сигнала от ядер  $^1\text{H}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{15}\text{N}$  и др. Ниже перечислены основные типы взаимодействий ядерных спинов, регистрируемые в твердотельной ЯМР спектроскопии.

Для ядер со спином  $I = 1/2$  наиболее сильными являются *диполь-дипольные* взаимодействия, которые представляют собой взаимодействие спина одного ядра с магнитным полем, генерируемым спином другого ядра, и наоборот. В органических соединениях, чаще всего, это взаимодействие между ядрами  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  и  $^1\text{H}$  с ядрами других элементов. *Химический сдвиг*

характеризует локальное электронное окружение ядра, которое экранирует внешнее магнитное поле. Данный тип взаимодействия несет информацию о химическом составе, строении и динамике молекулы. *Квадрупольное взаимодействие*, обусловленное взаимодействием квадрупольного момента ядра с градиентом электрического поля в его позиции, имеет место только для ядер со спином  $I > 1/2$ . Два наиболее важных для биологических исследований изотопа с квадрупольными ядрами – это природный изотоп  $^{14}\text{N}$  и  $^2\text{H}$ , в случае, когда он заменяет водород в молекулах. Для сравнения ниже приведен список взаимодействий ядерных спинов в аминокислотах белков в порядке убывания их интенсивности:

- $^{14}\text{N}$  квадрупольное взаимодействие в пептидной связи;
- $^{14}\text{N}$  взаимодействие в свободной аминогруппе;
- $^2\text{H}$  квадрупольное взаимодействие в меченых позициях;
- $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ ,  $^{14}\text{N} - ^1\text{H}$  и  $^{15}\text{N} - ^1\text{H}$  диполь-дипольные взаимодействия;
- $^{13}\text{C}$  химический сдвиг в ароматических кольцах и карбонильных группах;
- $^{15}\text{N}$  химический сдвиг в пептидных связях,
- $^{13}\text{C}$  химический сдвиг в алифатических группах;
- $^{15}\text{N}$  химический сдвиг в свободных аминогруппах.

ЯМР исследования белковых кристаллов часто дополняют рентгенодифракционные исследования данных белков и их исследования с помощью жидкостной ЯМР-спектроскопии. Для рентгеновской кристаллографии необходимы монокристаллы высокого качества, а использование жидкостной ЯМР-спектроскопии требует хорошей растворимости исследуемого вещества. Твердотельный ЯМР может применяться для плохо кристаллизующихся веществ или систем с ограниченной растворимостью (мембранные белки, белки с большой молекулярной массой). ЯМР твердого тела может давать информацию о структуре белка, дополняющую данные рентгеновской кристаллографии и

жидкостной ЯМР-спектроскопии, а также позволяет проводить сравнения между свойствами белка в растворе и твердом состоянии.

Твердотельная ЯМР-спектроскопия хорошо подходит для изучения динамики белковых молекул, так как в иммобилизованном состоянии для них возможны только внутримолекулярные движения, что устраняет необходимость разделения движений внутри отдельной молекулы и ее переориентации [40,41]

#### *1.1.6 Современная классификация белков*

Систематизация белков по их структуре является предметом дискуссии и фактически только-только формализуется. Эта систематизация в широком плане представлена ниже, здесь хотелось бы отметить следующее. В структурной классификации SCOP существует четыре основных класса белков: альфа-спиральные (А) белки, бета-складчатые (Б), два варианта их комбинаций А/Б (альфа-спирали и бета-тяжи комбинированы в структуре) и А+Б (альфа-спирали и бета-тяжи разобщены), а каждый класс в свою очередь включает в себя множество различных вариантов структурных мотивов [6]. На сегодняшний день в базе данных структур биомакромолекул депонировано около 95 тысяч белковых структур [protein databank, PDB: [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)]. Большинство из них имеет структурное сходство друг с другом, причем лишь в некоторых случаях это объясняется их общим происхождением в процессе эволюции и родством функций. Часто белки с одинаковыми структурными мотивами не являются эволюционно родственными. В этом случае их структурное сходство определяется общими физико-химическими принципами образования данных белков и топологией полипептидной цепи, а не гомологией аминокислотных последовательностей [6]. Для точного описания структурного сходства и эволюционных взаимоотношений были разработаны специальные иерархические структурные классификации - SCOP (структурная классификация белков [6]), CATH (структурная классификация белковых доменов [7]). Классификация



SCOP предполагает выделение шести уровней структурного сходства белков: вид (конкретные белки); белок (ортологичные белковые домены); семейство (сходство последовательности, структуры и функций, обусловленные общим происхождением данных белков); суперсемейство (сходство структуры и функций, предполагающее возможное эволюционное родство); укладка, или структурный мотив (общее структурное сходство, не подразумевающее общего происхождения белков) и класс (выделяется на основании преобладания тех или иных типов вторичной структуры в белке).

Как известно, функции белков определяются не только их структурой, но и динамикой. Так, например, функционирование ферментов тесно связано с движениями белка в различных временных масштабах, от фемтосекунд до миллисекунд [42]. Существуют работы, рассматривающие реакционную способность белков в контексте существования в них определенных низкочастотных возбуждений [43]. С помощью расчетов нормальных мод для различных белков в пределах семейства и суперсемейства было показано, что данные белки имеют значительное сходство по своей вибрационной динамике, при этом в процессе эволюции лучше всего сохраняются наиболее коллективные моды [44]. Сравнительный анализ данных рентгеноструктурного анализа, а именно, среднеквадратичных смещений атомов и В-фактора выявил, что гибкие и жесткие участки трехмерной структуры белка являются консервативными в процессе эволюции, а профиль значений В-фактора по полипептидной цепи хорошо воспроизводится для различных белков в пределах одного семейства. Также, теоретические расчеты В-фактора и среднеквадратичных смещений показали, что они в большей степени определяются фолдингом и структурой белка, и практически не зависят от последовательности аминокислот в полипептидной цепи [45].

Таким образом, сохранение функций того или иного белка в процессе эволюции требует консервации не только его аминокислотной

последовательности и структуры, но динамики. Из этого также следует, что структурный мотив белка должен коррелировать с его динамикой. При этом, экспериментально данный тезис был подтвержден лишь путем анализа величин В-фактора и среднеквадратичных смещений атомов, полученных из рентгеноструктурного анализа. Также не было изучено сходство динамики эволюционно родственных белков при их денатурации или же конформационных изменениях, которые имеют важное значения для их функционирования (например, при взаимодействии с лигандами или раскрытии активного центра белка).

## **1.2 Тепловая денатурация белков**

Одним из примеров фазовых переходов в биологических молекулах является денатурация (утрата нативного состояния). Денатурация - изменение структуры биополимеров: белков, нуклеиновых кислот и т.п., не сопровождающееся разрывом прочных ковалентных химических связей. К денатурации могут приводить различные изменения внешних параметров, таких как температура, pH раствора, добавление солей и др. Денатурация происходит при разрыве слабых связей, стабилизирующих пространственную структуру молекулы, например водородных связей и гидрофобных взаимодействий, характерных для ДНК и белков.

Рассмотрим подробнее тепловую денатурацию белков. В результате исследований с помощью инфракрасной спектроскопии и калориметрических методов, анализа спектров кругового дихроизма в ближнем и дальнем ультрафиолете, ЯМР, динамического и статического рассеяния света и др. показано, что при нагревании большинство белков путем кооперативного температурного плавления переходят в состояние «расплавленной» глобулы - промежуточное состояние между нативной и полностью разрушенной структурой [46]. Такой переход имеет характер фазового перехода первого рода. В нативном состоянии молекула белка является плотно упакованной, так что боковые группы, связанные с остовом

полипептидной цепи, имеют ограниченную свободу движений. Особенно ограничена свобода движений боковых групп, образующих гидрофобное ядро молекулы. При повышении температуры возрастают флуктуации отдельных групп атомов относительно молекулы. При температурах, меньших температуры плавления глобулы, данные флуктуации не велики и боковые группы не могут переходить из одного конформационного состояния в другое, молекула остается плотно упакованной. Дальнейшее повышение температуры приводит к тому, что термодинамически более выгодным становится плавление глобулы – сразу многие боковые группы становятся способны к поворотной изомеризации, глобула как бы разбухает и гидрофобные боковые группы становятся доступны растворителю. В водных растворах такой контакт оказывается энергетически невыгодным, и гидрофобные участки различных молекул стремятся слипнуться друг с другом. Таким образом, при близком расположении, несколько молекул объединяются в один агрегат, который растет с ростом числа открытых гидрофобных групп. Большое число агрегатов, сцепляясь между собой, приводят к переходу в гелеподобное состояние [47].

Рассмотрим переход молекулы из нативного состояния ( $N$ ) в денатурированное ( $D$ ) с точки зрения термодинамики. Изменение состояния белка при нагревании от  $T_1$  до  $T_2$  характеризуется изменением свободной энергии [48]

$$\Delta G_{d-n} = \Delta H_{d-n} - T\Delta S_{d-n} \quad (1.1)$$

или

$$\Delta G_{d-n}^{T_2} = \Delta H_{d-n}^{T_1} + \Delta C_p(T_2 - T_1) - T_2 \left( \Delta S_{d-n}^{T_1} + \Delta C_p \ln \frac{T_2}{T_1} \right) \quad (1.2)$$

где  $\Delta G_{d-n}$ ,  $\Delta H_{d-n}$ ,  $\Delta S_{d-n}$  и  $\Delta C_p$  - изменение свободной энергии, энтальпии, энтропии и теплоемкости при переходе белка из нативного в денатурированное состояние. Как видно из соотношения (1.1), изменение свободной энергии при денатурации происходит из-за изменения энтальпии

и энтропии системы при повышении температуры, которые определяются соответственно как

$$\Delta S_{d-n}^{T_2} = \Delta S_{d-n}^{T_1} - \Delta C_p \ln \frac{T_2}{T_1} \quad \text{и} \quad \Delta H_{d-n}^{T_2} = \Delta H_{d-n}^{T_1} - \Delta C_p (T_2 - T_1) \quad (1.3)$$

Из данных выражений видно, что из-за более резкого роста энтропии с повышением температуры (вследствие логарифмической зависимости  $S(T)$ ) по сравнению с энтальпией при некоторой температуре изменение свободной энергии станет положительным. В этом случае энергетически более выгодным становится переход белка в денатурированное состояние [49,50]. После того, как белковая молекула переходит в состояние «расплавленной» глобулы, при определенных условиях (например, при высокой концентрации белка) могут образовываться агрегаты [51,52]. Так как гидрофобные фрагменты полипептидной цепи при плавлении становятся «экспонированными» на поверхность «расплавленной» глобулы, то формирование агрегатов происходит за счет образования межмолекулярных  $\beta$ -складчатых контактов между этими гидрофобными областями. Дальнейшее повышение температуры приводит к переходу раствора в гелеподобное состояние.

Рассмотрим процесс денатурации БСА. В [53] было показано, что при несильном нагревании раствора BSA концентрации около 50 мг/мл в буферном растворе с pH = 8.0 до 323 К изменения в молекуле БСА обратимы, т.е. при охлаждении обратно до комнатной температуры молекула белка возвращается в свое нативное состояние. При нагревании выше 323 К изменения в молекуле становятся необратимыми. Это связано с тем, что в температурном диапазоне 332-336 К происходят значительные изменения во вторичной структуре молекулы белка [54], и в промежутке 336-339 К имеет место характерная температурная точка перехода БСА в денатурированное состояние [55]. При денатурации БСА начинает агрегировать, при этом с ростом температуры увеличивается размер агрегатов [56] и в районе

температуре 345 К идет формирование  $\beta$ -слоев [57]. Методом малоуглового рассеяния нейтронов было показано, что температура перехода в гель зависит от концентрации белка и особенно от pH раствора, и образующаяся гелеподобная структура может быть охарактеризована фрактальной размерностью, которая растет с дальнейшим ростом температуры после перехода в гель вплоть до насыщения [58].

Как хорошо видно из работ по рамановскому рассеянию в БСА [53,59], изменение пространственной организации белка приводит к изменению его колебательного спектра. Но нужно отметить, что детальный анализ поведения низкочастотной области колебательного спектра БСА при фазовых превращениях (денатурации, агрегации, перехода в гелеподобную фазу) фактически не проводился. Таким образом, целью нашей работы было выяснить, как изменяется низкочастотная динамика лизоцима и дейтерированного БСА при изменении его пространственной организации. Для этого использовалось мандельштам-бриллюэновское рассеяние света, которое является весьма чувствительным к тонким структурным изменениям и фазовым превращениям в конденсированных средах [60].

### **1.3 Колебательный спектр биополимеров**

В настоящее время изучению колебательного спектра белков уделяется большое внимание. Широкое использование методов нейтронной [61-64] и оптической [65-67] спектроскопии для исследования белков можно объяснить тем, что особенности функционирования белка определяются не только его структурой, но и динамикой. Отметим, что низкочастотная область колебательного спектра белковой молекулы отображает коррелированное движение, как целой макромолекулы, так и ансамблей макромолекул. Интерес к высокочастотной динамике белков обусловлен тем, что колебания на связях и аминокислотных остатках белковой молекулы, выполняющей ферментативную функцию, существенно влияют на образование фермент-субстратного комплекса и катализ. Высокочастотная

область колебательного спектра лизоцима достаточно хорошо исследована с помощью оптической спектроскопии, и большинство высокочастотных возбуждений белков описаны в литературе [65].

Однако не существует устоявшейся точки зрения на вклады различных процессов в низкочастотную область колебательного спектра белков. Исследователи сходятся в том, что при энергиях  $E < 2$  мэВ существенным являются релаксационные процессы, проявляющиеся как релаксационная мода в неупругом рассеянии света и нейтронов [61-63]. На рис. 1.9 показаны результаты квазиупругого рассеяния нейтронов в миоглобине [61]. Видно, что можно выделить вклад двух релаксационных процессов: медленных  $\alpha$ -процессов и быстрых  $\beta$ -процессов, которые имеют разную форму и температурную зависимость. Согласно теории связанных мод  $\alpha$ -релаксация представляет собой коллективные возбуждения, которые нарастают в резуль-

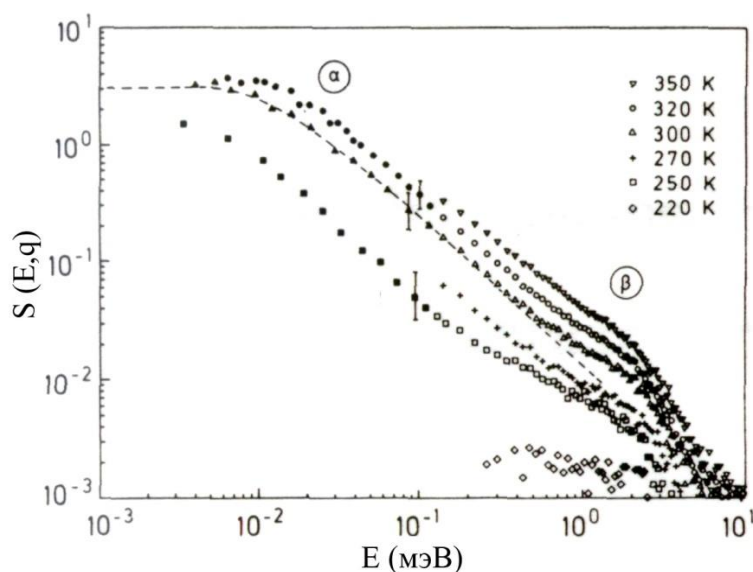


Рис. 1.9: Спектры квазиупругого рассеяния нейтронов миоглобина [61]

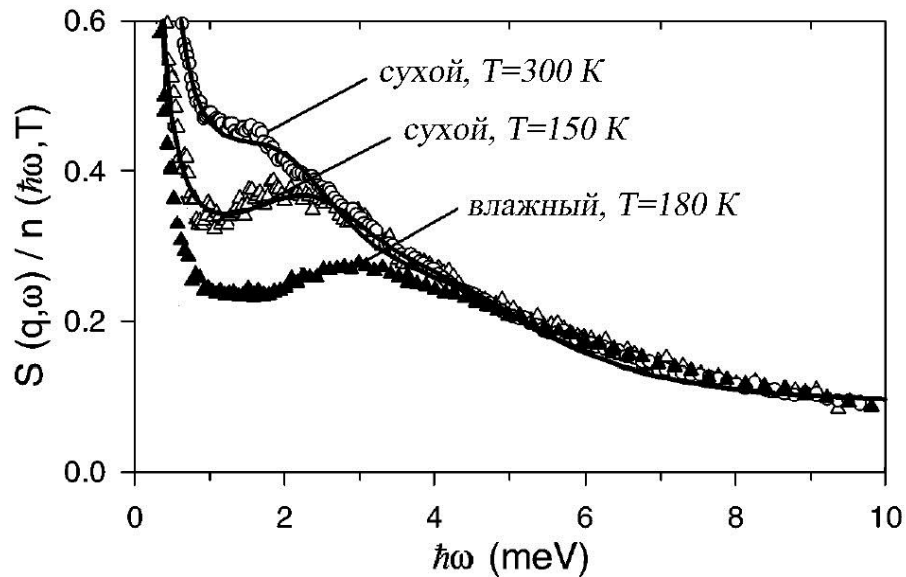


Рис. 1.10: Некогерентный структурный динамический фактор влажного и сухого миоглобина при 150 K, 180 K и 300 K, нормированный на фактор Бозе-Эйнштейна  $n(\omega, T) = 1/[\exp(\hbar\omega/k_B T) - 1]$  [66]

тате нелинейной связи между флуктуациями плотности. Для описания формы  $\alpha$ -релаксационной моды жидкостей или полимеров часто используют функцию Кола-Девидсона.  $\beta$ -релаксация соответствует локальным колебаниям атомов в пространстве, ограниченных соседними атомами.

В спектрах рассеяния света и нейтронов ряда белков обнаружено акустоподобное возбуждение, характерное для неупорядоченных систем (стекол, переохлажденных жидкостей и т.д.) и называемое «бозонный пик» [66, 68-70]. Он особенно хорошо виден в низкочастотной области спектров неупругого рассеяния при низких температурах. Для лизоцима частота «бозонного пика» соответствует 4 мэВ в окрестности 200 K. По мере роста температуры частота максимума «бозонного пика» смещается в низкочастотную область и сам пик становится «невиден» за счет возрастания вклада релаксационной составляющей (рис. 1.10). Вопрос о происхождении «бозонного пика» до сих пор вызывает ожесточенные споры. С феноменологической точки зрения, считается, что появление этого возбуждения в стеклоподобных системах связано с низкотемпературными

аномалиями удельной теплоемкости и теплопроводности стекол [71]. С другой стороны, предлагаются различные теоретические модели для объяснения природы «бозонного пика». Сравнительно недавно, например, было показано, что пик может быть обусловлен взаимосвязью флуктуаций плотности и колебательных мод в таких системах, как стекла [72]. Считается, что появление «бозонного пика» связано с топологическим беспорядком в системе, и обусловлено рассеянием на делокализованных низкочастотных колебаниях [68, 69].

При понижении температуры ниже 180-200 К в белках происходит стекольный фазовый переход (также его называют динамическим фазовым переходом), который хорошо виден при исследовании температурного поведения среднеквадратичного смещения атомов. На рис. 1.11 представлена зависимость среднеквадратичного смещения атомов лизоцима от температуры [73]. Хорошо видно, что в диапазоне от 5 К до 180 К  $\langle \Delta x^2 \rangle$  пропорционально температуре и возрастает при возрастании  $T$ , однако выше 200 К наблюдается уменьшение интенсивности рассеяния в области малых волновых векторов (и, соответственно, резкий рост  $\langle \Delta x^2 \rangle$ , как видно на рис. 1.11), что свидетельствует о появлении новых степеней свободы. При этом форму пика упругого рассеяния, которая имеет форму гауссиана ниже 180 К, выше точки перехода уже нельзя описывать подобным образом. Выше 200 К растет вклад ангармоничности в динамику лизоцима, которую связывают с либрациями боковых остатков и с изменением динамики водородных связей. Необходимо отметить, что динамический переход зависит от влажности исследуемого образца и наблюдается только в образцах, влажность которых не меньше 0.2. Такое температурное поведение среднеквадратичного смещения атомов, как на рис. 1.11, было найдено и для других белков [61]. Интересно, что данный динамический переход коррелирует с появлением каталитической активности белков, что свидетельствует о важной роли



медленных релаксационных процессов для функционирования биополимеров [73].

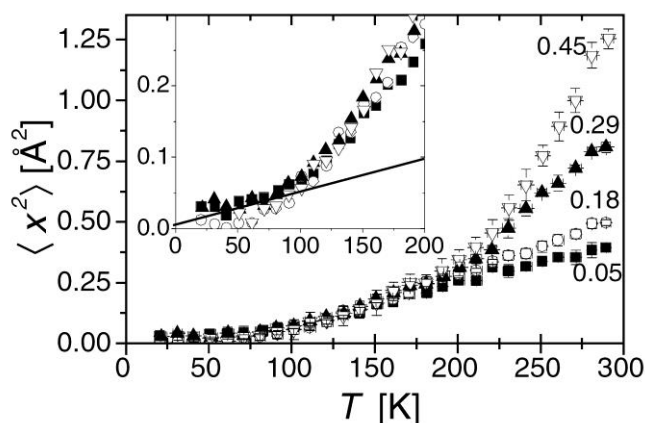
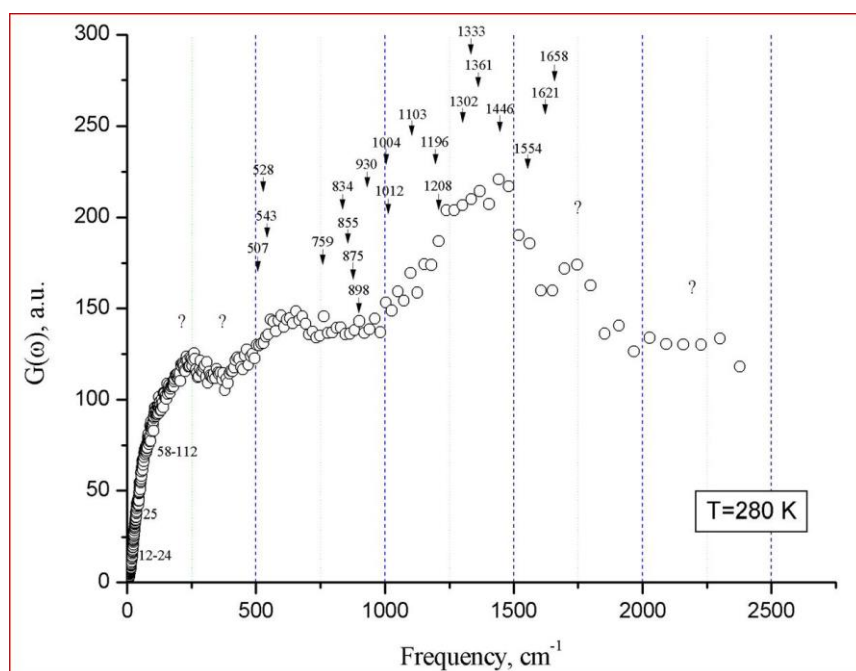


Рис. 1.11: Изменение среднеквадратичного смещения атомов лизоцима с температурой для образцов с различной степенью гидратации: ■, 0.05; ○, 0.18; ▲, 0.29; ▽, 0.45 [73]

Колебательные спектры макромолекул и, в первую очередь белков являются объектами интенсивных исследований с помощью оптической и нейтронной спектроскопии [74-80]. Это объясняется тем, что для понимания механизмов функционирования белков необходимо иметь представления не только о структуре, но и о динамике белковой молекулы.

На рис.1.12 показана обобщенная плотность колебательных состояний лизоцима при  $T = 280\text{K}$  в диапазоне частот  $12\text{-}2400\text{ см}^{-1}$  ( $1\text{ мэВ} = 8.06\text{ см}^{-1}$ ). Поведение низкочастотной области колебательного спектра белков при энергиях  $E < 16\text{ см}^{-1}$  определяется релаксационными процессами, проявляющимися как квазиупругая компонента в спектрах рассеяния света и нейтронов [74, 76].



*Рисунок.1.12 Обобщенная плотность колебательных состояний лизоцима при  $T=280\text{K}$ [75]*

Основные возбуждения, присутствующие в колебательном спектре лизоцима, представлены в виде таблицы и указаны на рис. в виде стрелок со значением частоты соответствующего возбуждения. Данные взяты из работ по оптической спектроскопии белков [79] и [80]. Необходимо отметить, что разрешение, достигаемое в оптической спектроскопии существенно лучше, чем нейтронной, поэтому на графике функции  $G(E)$ , представленной на рис. 1.12 достаточно сложно выделить отдельные колебания в случае их близкого расположения по частоте. Исследования колебательного спектра лизоцима, выполненные на кристаллах тетрагональной сингонии с помощью рамановского рассеяния света, с хорошей точностью позволили идентифицировать большинство высокочастотных возбуждений [79, 80]. Среди них выделяют группу симметричных колебаний на дисульфидных связях ( $507$  и  $528\text{ cm}^{-1}$ ), C-C связях ( $898$  и  $930\text{ cm}^{-1}$ ), C-N связях ( $1103\text{ cm}^{-1}$ ), аминокислотных остатках трипсина ( $543$ ,  $759$ ,  $875$ ,  $1012$  и  $1361\text{ cm}^{-1}$ ), тирозина ( $834$ ,  $855$  и  $1208\text{ cm}^{-1}$ ) и фенилаланина ( $1004$  и  $1196\text{ cm}^{-1}$ ). К асимметричным колебаниям относятся деформационные колебания групп

CH (1333 и 1361  $\text{см}^{-1}$ ), CH<sub>2</sub> и CH<sub>3</sub> (1446  $\text{см}^{-1}$ ) и колебания остатков триптофана, тирозина и фенилаланина (1621  $\text{см}^{-1}$ ). Кроме того, в спектрах КРС наблюдаются пики при 1554  $\text{см}^{-1}$  (остаток триптофана) и 1658  $\text{см}^{-1}$  (амидная группа I). На рис. 1.12 показаны стрелками положение всех перечисленных возбуждений и их частоты в высокочастотной области функции плотности колебательных состояний лизоцима.

Кроме тех возбуждений, которые указаны выше (рис.1.12), в колебательном спектре лизоцима существуют колебания, которые требуют дополнительных исследований. Это возбуждения, локализованные в частотном диапазоне частот от 230 до 400  $\text{см}^{-1}$ , от 2050 до 2300  $\text{см}^{-1}$ , а так же в окрестности 1745  $\text{см}^{-1}$  (на рис. данные колебания обозначены вопросами).

<b><i>Частота , <math>\text{см}^{-1}</math></i></b>	<b><i>Колебание</i></b>	<b><i>Работы с соответствующими данными</i></b>
> 12	релаксационные процессы	A. R. Bizzarri et al. [74], G. Caliskan et al. [76].
12-24	акустические фононы	С.Г. Лушников и др. [75]
25	бозонный пик	A. R. Bizzari et al. [74], G. Caliskan et al. [76], H. Urabe [77].
58-112	Фрактон	С.Г. Лушников и др. [75]
	<b><i>Локализация высокочастотных колебаний в молекуле лизоцима</i></b>	
507, 528	дисульфидная связь	А.В. Kudryavtsev et al. [79]

543, 759	остаток триптофана	A.B. Kudryavtsev et al. [79]
834, 855	остаток тирозина	A.B. Kudryavtsev et al. [79]
875, 1012, 1208	остаток триптофана	A.B. Kudryavtsev et al. [79]
898, 930	C-C связь	J. Jacob et al. [80]
1004, 1196	остаток фенилаланина	A.B. Kudryavtsev et al. [79]
1103	C-N связь	J. Jacob et al. [80]
1333, 1361	деформационные колебания остатков триптофана и CH группы	J. Jacob et al. [80]
1446	деформационные колебания CH <sub>2</sub> и CH <sub>3</sub> группы	A.B. Kudryavtsev et al. [79]
1554	остаток триптофана	A.B. Kudryavtsev et al. [79]
1621	остатки триптофана, тирозина и фенилаланина	J. Jacob et al. [80]
1658	амидная группа I	A.B. Kudryavtsev et al. [79]

*Таблица 1. Возбуждения, обнаруженные в колебательном спектре лизоцима и соответствующие им частоты или диапазоны частот[75]*

## **Глава 2**

### **Материалы и методы исследования**

#### **2.1 Биологические материалы и химические реагенты**

Биологические материалы: белки БСА и лизоцим куриного яйца были куплены в фирме Sigma. Химические реактивы: Азид натрия (Fluka, США); рН-метрия – набор стандарт-титров для рН-метра («Экрос», Россия); концентрированная серная кислота, соляная кислота, хлорид натрия, фосфат натрия, хлорид калия, гидроксид натрия, фосфат калия – производитель «Нева реактив», Россия. Материалы: полистерольные микропробирки на 1.5 мл (Biohit, Финляндия); наконечники для дозаторов на 10 мкл, 200 мкл, 1000мкл (Biohit, Финляндия); фильтры с порами 0.45 мкм (Sigma, США), шприцы на 20 мл.

#### **2.2 Оборудование**

1) Портативный рН-метр с гелевым электродом для измерения рН растворов в диапазоне от 0.00 до 14.00 в при температурах от 0°C до 70°C, к нему прилагается электрод для измерения температуры раствора (модель HI 8314, Hanna instrument, Италия);

2) Дозаторы механические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей для диапазонов 0.5-10 мкл, 10-100 мкл, 100-1000 мкл (Biohit, Финляндия);

3) Весы лабораторные аналитические модели ВЛА-200г-М (АДВ-200М), завод «ГОСМЕТР», Ленинград (Россия);

4) Холодильник Bocsh (Германия);

5) Сушильный шкаф ШСУ, «Электроприбор» (Россия);

6) Центрифуга MiniSpin со стандартным ротором, анодированный алюминий, угол 45°, 12 ячеек для микроцентрифужных пробирок 1.5 / 2.0 мл с макс. диам. 11 мм, ускорение до 13 000 об./сек., (Eppendorf, Германия).

## 2.3 Приготовление растворов

Для изучения БСА были приготовлены натрий-фосфатный буфер, с  $\text{pH} = 7,45$ , представляющий из себя раствор солей, содержащий хлорид натрия, фосфат натрия, хлорид калия и фосфат калия, приготовленный на тяжелой воде ( $\text{D}_2\text{O}$ ), и раствор БСА в PBS буфере на тяжелой воде. Для экспериментов с БСА концентрация белка в растворах составляла 100 мг/мл.

Для исследования колебательного спектра растворов с различным показателем  $\text{pH}$  были приготовлены 0.1 М натрий-фосфатного буфера (PBS буфер,  $\text{pH}=7,45$ ) и раствор белка лизоцим с концентрацией 250 мг/мл в PBS буфере.

Пропорции растворенных солей для достижения определенной  $\text{pH}$  известны, полученные растворы дополнительно проверялись на  $\text{pH}$ -метре, при необходимости доводка до нужной  $\text{pH}$  проводилась добавлением соляной кислоты или гидроксида натрия.

## 2.4 Установка МБР

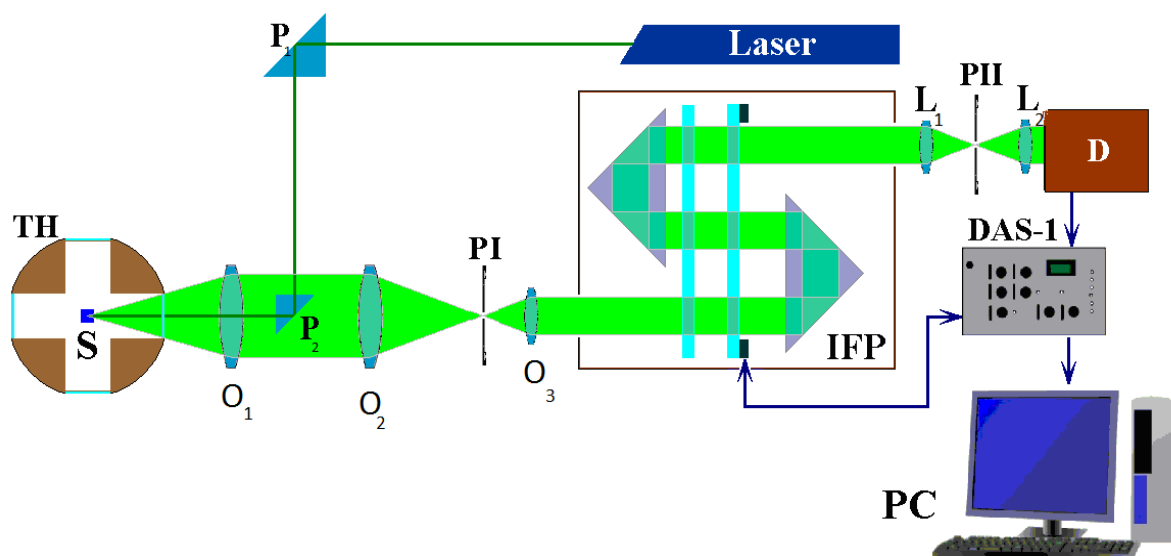


Рис. 2.1: Блок-схема МБ установки.  $S$  – образец,  $TH$  – печька,  $IFP$  – интерферометр Фабри-Перо,  $D$  – ФЭУ-79,  $P_1 - P_2$  – поворотные призмы,  $O_1, O_2, O_3, L_1, L_2$  – линзы,  $PI$  и  $PII$  – точечные диафрагмы.

Экспериментальная установка, используемая в настоящей работе для изучения МБР, состоит из:

1. Одномодовый лазер “Spectra Physics”.
2. Система фокусировки рассеяного света.
3. Трехпроходной пьезосканируемый интерферометр Фабри-Петро (ИФП) “Burleigh”.
4. Система DAS-1(регистрация сигнала и юстировка ИФП).
5. Компьютер.
6. Печка с системой автоматического регулирования температуры

Блок-схема установки представлена на рис 2.1. Луч лазера с исходной мощностью 100мВт и длиной волны  $\lambda=488$  Нм с помощью подвижных призм  $P_1 - P_2$  подводится к образцу по схеме 180-градусной геометрии рассеяния. Исследуемый раствор помещался в фокальной плоскости объектива  $O_1$  (фокусное расстояние – 25 см, диаметр – 5см), который выполняет двойную роль (фокусирует исходный луч на растворе и собирает рассеянный раствором свет в телесном угле, определяемый апертурой объектива  $O_1$  ). После  $O_1$  рассеянный свет шел параллельным пучком, в который вводились светофильтры для ограничения интенсивности рассеяного света при сканировании рэлеевской линии. Далее объектив  $O_2$  фокусировал рассеянный свет на диафрагму PI (круглое отверстие диаметром 100 мкм). Круглое отверстие (пинхол) являлось точечным источником, находящимся в фокальной плоскости объектива  $O_3$ . После  $O_3$  свет попадал в виде пучка параллельного света на вход ИФП.

Основной характеристикой любого спектрального прибора является разрешающая способность, которая показывает, какие две линии примерно одинаковой интенсивности, расположенные близко друг к другу, еще можно разрешить с помощью такого прибора [81,82]. Однако в эксперименте по МБР света нужно учитывать и другое требование – необходимо разделить

две очень близкие по частоте линии, одна из которых по интенсивности на несколько порядков меньше другой. Поэтому в качестве второй основной характеристики прибора выступает величина контраста ( $C$ ) – отношение максимальной  $I_1$  и минимальной  $I_2$  интенсивностей пропускания интерферометра для данной монохроматической линии. Тогда для разрешения двух линий, кроме достаточно большой разрешающей способности, спектрометр должен иметь величину контраста, удовлетворяющую условию  $C > I_1/I_2$ .

Идеальный плоский ИФП состоит из двух совершенно плоских, параллельных, не поглощающих зеркал с коэффициентом отражения  $R$ , длина оптического пути между которыми равна  $n't$ , где  $n'$  – показатель преломления среды между ними,  $t$  – расстояние между зеркалами. Такое устройство представляет собой эффективный интерференционный фильтр, распределение интенсивности которого в интерференционной картине дается формулой Эйри

$$I = I_0 \frac{T^2}{(1-R)^2} \frac{1}{1+(4F^2/\pi^2)\sin^2(2\pi t/\lambda)} \quad (2.1)$$

где  $T$  – коэффициент пропускания,  $F$  – острота прибора ИФП,  $R$  – коэффициент отражения стекол. Как следует из (2.1) точки максимального пропускания разделены интервалом частот

$$f = 1/2t \quad (2.2)$$

который называется областью свободной дисперсии интерферометра или свободным спектральным интервалом (FSR). Обозначив полуширину линии максимума пропускания через  $\delta\lambda$ , можно определить остроту ИФП  $F = f/\delta\lambda$ . Таким образом, острота определяет разрешающие свойства ИФП. На практике величина  $\delta\lambda$  определяется: 1) коэффициентом отражения пластин  $F_R = \pi R^{\frac{1}{2}}/(1-R)$  2) качеством обработки поверхности пластин  $F_f$ , который можно найти по эмпирическому правилу, согласно которому, если пластины обработаны с точностью  $\sim 1/S$  от длины волны, то острота  $F_f = S/2$  ; 3)



степенью параллельности пластин; 4) потерями в отражающих покрытиях. Для видимого света предельное разрешение чаще всего определяется первыми двумя параметрами.

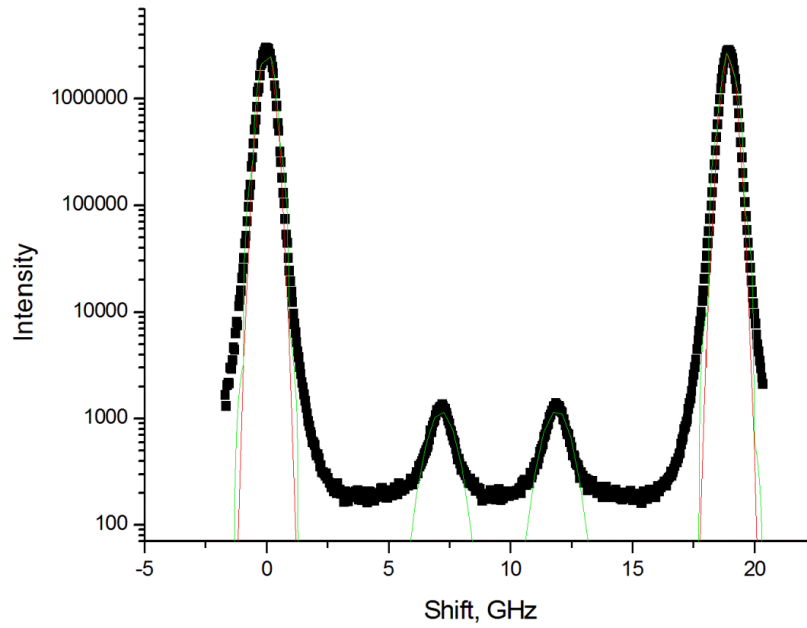
Параллельность пластин поддерживалась автоматически с помощью системы DAS-1. Влияние флуктуаций температуры и давления в области пластин-зеркал ИФП было сведено к минимуму за счет помещения ИФП в изотермическую камеру.

Если свет проходит один раз через интерферометр, то величина контраста согласно (2.1) равна

$$C_1 = \frac{I_{max}}{I_{min}} = 1 + \frac{4F_1^2}{\pi^2} \approx \frac{4F_1^2}{\pi^2} \quad (2.3)$$

где  $\frac{1}{F_1^2} = \sum_i (1/F_i^2)$ ,  $i=R, f$ . Если свет проходит через интерферометр  $m$  раз, то суммарная острота определяется формулой  $F_m = \frac{F_1}{\sqrt{2^{1/m}-1}}$ , а суммарный контраст  $C_m = (C_1)^m$ .

Во всех изучаемых в данной работе растворах, в экспериментах по МБР света применялась  $180^\circ$  геометрия рассеяния света. Расстояние между пластинами интерферометра было 7.5 мм, что соответствует свободному спектральному интервалу (FSR) 20 ГГц. Коэффициент отражения пластин интерферометра  $R = 0.93$ , откуда  $F_R \approx 43.3$ . Точность обработки пластин  $\lambda/100$  и  $F_f = 50$ . Тогда суммарный контраст трехпроходного интерферометра ФП  $C_3 = (C_1)^3 \cong 8,2 * 10^7$ . Время записи одного спектра в экспериментах составляло 300 с.



*Рис.2.2: Экспериментальный спектр МБР света в растворе БСА ( $C = 100$  мг/л).*

Пример экспериментального спектра МБР света в растворе, приведен на рис. 2.2. Спектры рассеяния описывались суммой гауссиана, соответствующего рэлеевскому рассеянию и двух лоренцианов, которые соответствовали МБ компонентам.

$$I = \sum_{i=1,2} \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{\frac{-(\omega-\omega_i)^2}{2\sigma^2}} + \sum_{i=1,2} \frac{1}{\pi} \left( \frac{\gamma}{(\omega-\omega_i)^2 + \gamma^2} \right)$$

Определив из расчетов величину сдвига частоты компонент МБР  $\Delta\nu$ , как положение максимума лоренциана относительно максимума гауссиана, можно рассчитать скорость гиперзвука в растворе. Пример обработки спектра представлен на рис. 2.2.

## Глава 3

### Экспериментальные результаты и обсуждение

#### 3.1 Влияние кислотности на динамику фазовых превращений лизоцима

Основное внимание исследователей при исследовании низкочастотной динамики биополимеров акцентировалось на денатурации, в то время как существование предшествующей фазы и дальнейшего перехода биополимеров в гель состояние детально не анализировалось. Это мотивировало нас на детальное исследование влияние различных внешних факторов на динамику фазовых превращений в биополимерах на примере лизоцима. Одним из важных факторов, влияющих на поведение белков при изменении температуры относится кислотность раствора. Известно, что в растворах разной pH белки могут иметь разные структурные конформации и разную стабильность, что оказывает влияние на процесс денатурации [83]. Наиболее изученным белком является лизоцим. Эксперименты по исследованию низкочастотной области колебательного спектра лизоцима при повышении температуры проводились с помощью МБР света как в ФТИ им. А. Ф. Иоффе РАН [2,3], так и в Австрии [4]. Было установлено, что в растворе лизоцима в натрий ацетатном буфере спектр рассеяния при нагревании образцов от комнатной до 360 K наблюдаются аномалии как скорости гиперзвука, так и интенсивности МБ дублета. Испытывает аномалии и интенсивность рэлеевского рассеяния. Эти аномалии связывались авторами работ как с переходами промежуточную фазу, предшествующую денатурации лизоцима, так и с критическим поведением системы при переходе в гелеподобную фазу. В данном разделе мы обсуждаем зависимость низкочастотной динамики лизоцима от кислотности среды при нагревании, имея в виду, что для нейтральной среды, соответствующей натрий ацетатному буферу с pH=7.45 лизоцим при денатурации не проходит через промежуточную фазу, как в случае кислой среды (натрий ацетатный буфер с pH=4,6) [84]. Для анализа влияния

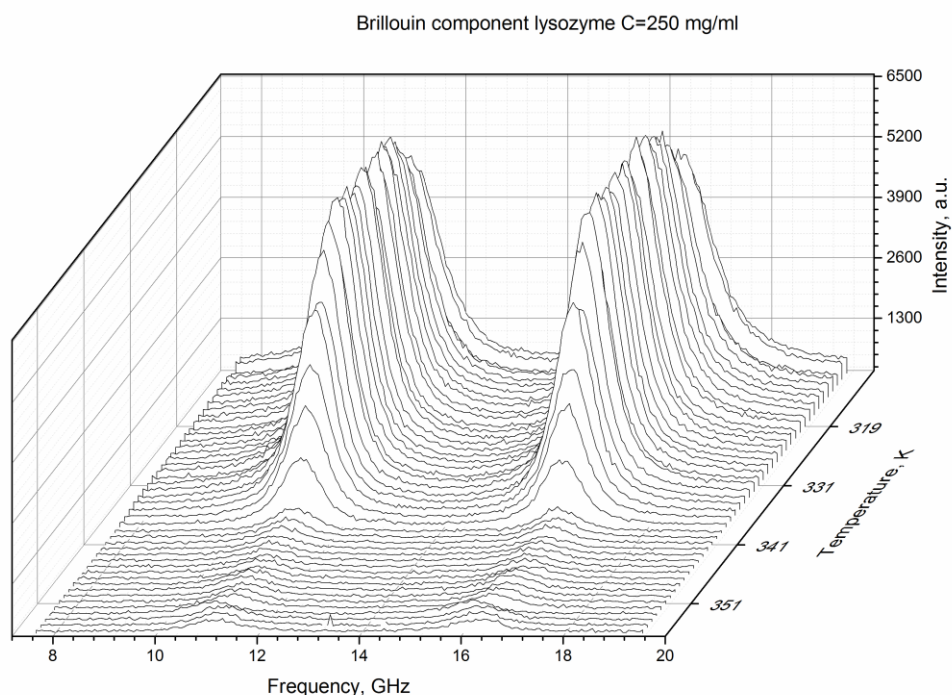
кислотности мы проводили исследования МБР света в растворе лизоцима с концентрацией 250 мг/мл в натрий фосфатном буфере и сопоставляли полученные результаты поведения лизоцима в кислой среде, т.е. с данными, взятыми из работы [3]. Здесь нужно отметить, что все измерения МБР света проводились по той же схеме, как и предшествующие [2,3], что дало нам возможность для корректного сопоставления данных.

Эксперименты по МБР света проводились на 3-проходном пьезосканируемом интерферометре Фабри-Перо. В качестве источника света в экспериментах использовался аргоновый лазер с длиной волны  $\lambda=488$  нм и с мощностью 100 мВт. Луч лазера проходил через оптическую схему и фокусировался в образце. В экспериментах использовалась  $180^\circ$  геометрия рассеяния света. Расстояние между пластинами интерферометра было 7.5 мм, что соответствует свободному спектральному интервалу (FSR) 23 ГГц. Время записи одного спектра в экспериментах составляло 300 с. Температура растворов повышалась от 293 до 364 К с точностью  $\pm 0.1^\circ\text{K}$ .

На рисунке 3.1 приведена панель спектров интенсивности компонент МБР для различных температур для раствора лизоцима в натрий-фосфатном буфере. На графике видно, что начиная с температуры 335К, наблюдается падение величины интенсивности компонент МБР на нескольких порядков, достигает минимума в окрестности 340 К и незначительно увеличивается. Такое же поведение интенсивности компонент МБ наблюдалось и в натрий ацетатном буфере. Можно дополнительно отметить, что раствор лизоцима мутнеет при  $T > 337$  К, становится не прозрачным. В этой же области температур видно изменение сдвига частоты и полуширины обсуждаемых компонент спектра рассеяния. Ниже, мы будем обсуждать результаты расчетов при математической обработке экспериментальных спектров, которые проводились по процедуре, обсуждаемой в главе 2 данной работы.

На рис. 3.2 представлены температурные зависимости относительного изменения скорости гиперзвуковых упругих волн (далее - просто скорости), распространяющихся в двух растворах буферов (натрий ацетатном

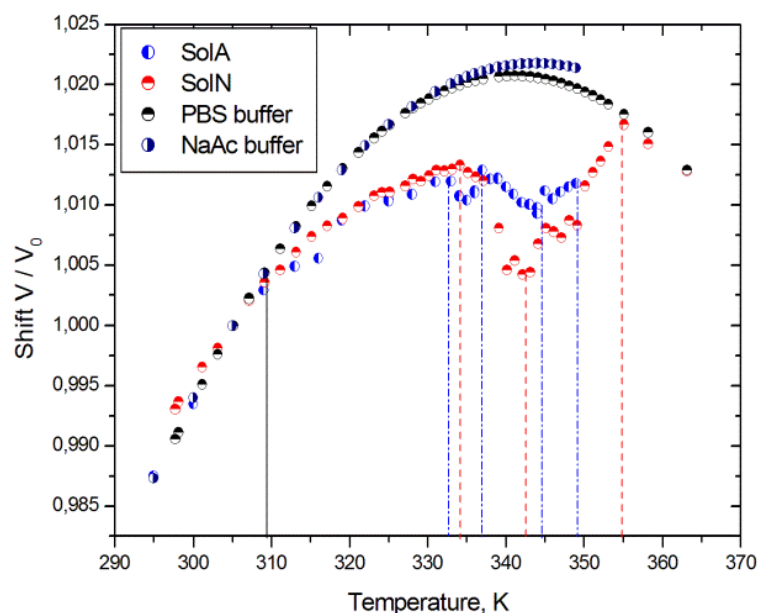
и натрий фосфатном) и в растворах лизоцима в указанных выше буферах. Температурные зависимости скорости в растворах лизоцима в натрий ацетатном буфере и собственно в натрий ацетатном буфере взяты из работы [3]. Все четыре зависимости были нормированы и в качестве базовой скорости, на которую проводилась нормировка было взято значение скорости при  $T=305,15$  К. В дальнейшем, для удобства раствор лизоцима в NaAc буфере будем называть SolA, в PBS буфере – SolN.



*Рисунок 3.1 Панель спектров интенсивности компонент МБР для различных температур для раствора лизоцима в натрий-фосфатном буфере*

На рисунке 3.2 хорошо видно, что поведение скорости различно в растворах лизоцима с различной кислотностью выше 310 К, где температурные зависимости скорости в растворах лизоцима начинает отклоняться от температурных зависимостей в буфере. Различия в поведении скорости в высокотемпературной области в натрий ацетатном и натрий фосфатном буфере обусловлено различным составом и, соответственно, различной жесткостью раствора. Поведение скорости звука в растворах

лизоцима с различной кислотностью различно. Наиболее ярко это проявляется в области температур выше 330 К. Для лизоцима, находящегося в кислой среде (натрий ацетатный буфер) мы видим две характерные аномалии в температурной зависимости скорости гиперзвука, в окрестности 333 К и 344 К, в то время как для лизоцима, находящегося в нейтральной среде - наблюдается только одна аномалия в окрестности 343 К (Рис.3.2). Очень интересным является тот факт, что в высокотемпературной области поведение скорости звука в растворах лизоцима в натрий ацетатном буфере вновь возвращается к той зависимости, что наблюдается скорости звука в буфере (см. рис.3.2).

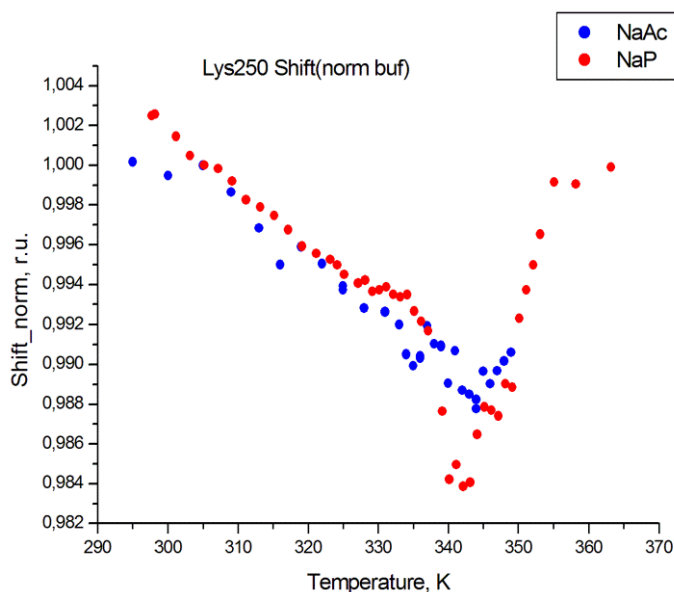


*Рис.3.2. Температурные зависимости относительного изменения скорости гиперзвука в растворах лизоцима (синий в кислом буфера, красный в нейтральном) и в буферных растворах (○ для NaAc буфера, ● для PBS нейтрального).*

Анализ температурного поведения сдвига частоты в растворах лизоцима затруднителен на фоне постоянного вклада нелинейной зависимости сдвига в буфере, динамика которого заведомо не имеет никаких аномальных вкладов при изменении температуры. Поэтому, для того чтобы

выделить собственную низкочастотную динамику белка необходимо провести нормировку на температурную зависимость сдвига частоты и полуширины в буфере, полагая, что вклады аддитивны. Полученные температурные зависимости поведения скорости мы условно назвали "чистой динамикой" лизоцима. На рис.3.3 представлены температурные зависимости скорости звука в растворе лизоцима нормированной на буфер. Хорошо видно на рисунке, что нами наблюдаются аномалии в окрестности температур денатурации лизоцима. Нужно отметить, что процесс денатурации белков – сложный многоступенчатый динамический процесс, в течение которого происходит утрата нативного состояния молекулы белка с образованием агрегатов, существование которых приводит к переходу системы у гелеподобное состояние. Для рассмотрения вкладов различных процессов вовлеченных в денатурацию молекулы лизоцима, на графиках скорости гиперзвука можно выделить несколько участков, которые будут отражать изменения в конформациях макромолекулы в растворах с различным показателем pH.

Выделим первый участок до температуры в 310 K, на котором относительное изменение скорости гиперзвука в растворах лизоцима ведет себя так же, как и скорость звука в соответствующих буферах. На рис.3.2 и 3.3 это соответствует линейному участку в температурных зависимостях поведения скорости. Дальнейшее повышение температур приводит к аномальному, отличному от буфера, поведению скорости звука в растворах белков, что означает появление вклада собственной динамики белка в температурную зависимость скорости гиперзвука.



*Рис.3.3 Нормированная на буфер температурная зависимость величины сдвига бриллюэновских компонент для лизоцима в натрий ацетатном (синие кружки) и натрий фосфатном (красные кружки) буферах.*

На второй участок (Рис. 3.2 и 3.3) на котором скорости гиперзвука SolA и SolN ведут себя схоже и монотонно увеличиваются при повышении температуры до 333 К для SolA и до 330К для SolN, при дальнейшем нагревании до 334 К, скорость звука в растворе SolN не изменяется.

Третий участок, характерен только для SolA, это область температур 333К – 337К. В этом диапазоне температур, молекула лизоцима находится в состоянии расплавленной глобулы, который также называют интермедиатным состоянием [46]. Возможность существования интермедиатного состояния при более низком показателе pH, может быть объяснено различием величины сил гидрофобного взаимодействия между раствором и молекулой лизоцима. За счет ослабления гидрофобных взаимодействий, молекула лизоцима в NaAc буфере более “рыхлая”, большая степень свободы позволяет ей, находиться в стабильном состоянии. Большая температурная стабильность молекулы лизоцима в растворе SolA с pH= 4.6 отмечается в исследованиях инфракрасного диапазона колебательного спектра [83].

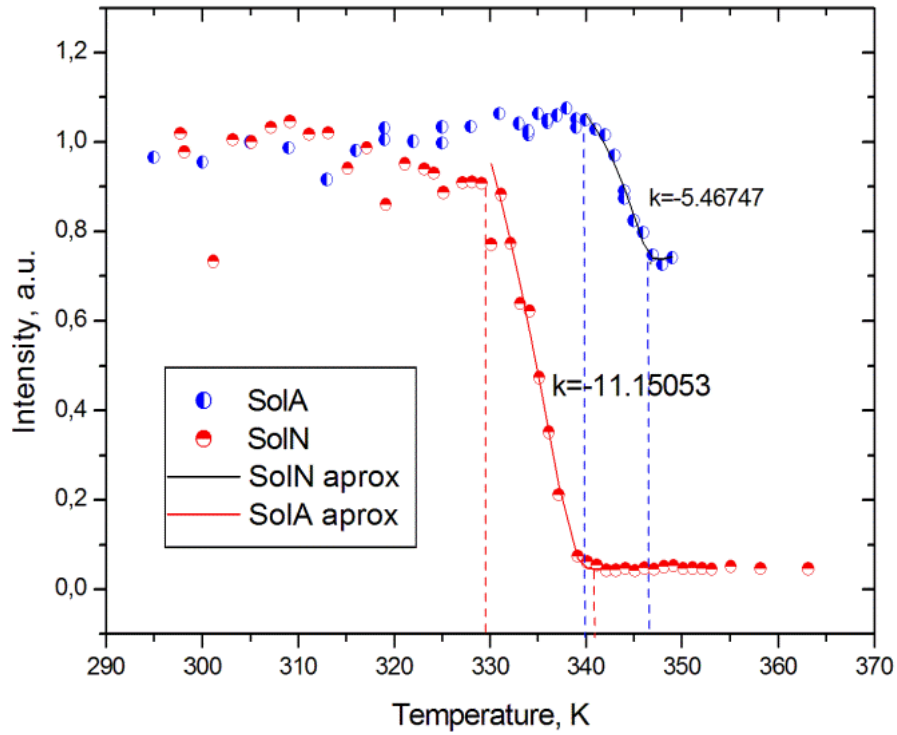


Четвертый участок присутствует для обоих растворов лизоцима, он отражает изменения во вторичной структуре белка. Для SolA диапазон температур составляет 337К – 345К, для SolN - 334К – 343К. В этих диапазонах температур, скорость звука монотонно уменьшается. Этот участок в температурной зависимости заканчивается минимумом в скорости звука что связывалось в работе [2,3] с золь-гель переходом. Уменьшение скорости в предпереходной области может быть связано с агрегацией молекул. Величина скачка в изменении скоростей различена, для раствора SolN величина скачка в два раза больше, чем в SolA. Более узкий, а также начинающийся позже переход золь-гель для SolA, говорит о большей температурной устойчивости макромолекулы при изменении температуры. Большая стабильность системы по всей видимости достигается за счет большей степени свободы “рыхлой” структуры глобулы при более низкий значениях pH.

Пятый участок соответствует монотонному увеличению величины скорости звука. Для SolA диапазон температур составляет 345К – 350К, для SolN диапазон температур составляет 343К – 355К. На данном участке изменение скорости звука связано с увеличением внутренней энергии геля, в который перешла система.

Изменение интенсивности компоненты МБР, которое хорошо видно на рис.3.1, где приведены экспериментальные спектры рассеяния мы уже отмечали при обсуждении результатов экспериментов. На рисунке 3.4 приведены температурные зависимости интенсивностей компонент МБР. Резкое падение значений интенсивности с начинается с температуры 330К для SolN, и 340 К для SolA, свидетельствует о увеличении величины центров рассеяния, т.е. о процессе агрегации, в ходе которого идет слипание молекул. Дальнейшее повышение температур приводит к переходу раствора в гель. Существует два взаимодействия сопровождающие процесс гелеобразования: взаимодействия белок-белок и белок-раствор. Первый вид - белок-белок взаимодействия, происходят за счет увеличения межмолекулярных бетта

структур, что позволяет одной молекуле цепляться за другую. Вторым видом взаимодействия белок-раствор, в процессе повышения температуры активные центры открываются, тем самым открывая доступ молекул растворителя к неполярным основаниям. Гидрофобные силы, отвечающие за возникновение пространственной структуры белков в растворах, разворачивают белки активными центрами друг к другу. Увеличение pH системы означает уменьшение поверхностного заряда глобулы, что уменьшает белок-белок взаимодействие, и отражается уменьшением температурной стабильности лизоцима в SolN. Увеличение pH увеличивает величину гидрофобных взаимодействий между белком и раствором, что означает более компактную структуру глобул в SolN. Агрегирование и гелеобразование сопровождается падением прозрачности раствора, и нам нужно рассматривать уже измененные условия рассеяния света при обсуждении результатов экспериментов. В работе [3] была предложена модель поведения интенсивности компонент МБР в условиях многократного рассеяния, которое реализуется в нашем случае. Рассмотрим подробнее предложенную в [3] модель.



*Рисунок 3.4. Температурные зависимости относительного изменения интенсивности компонент МБР для SolA и SolN с аппроксимацией по модели романова.*

В жидкостях компоненты дублета возникают за счет рассеяния света на адиабатических флуктуациях плотности. При данном угле рассеяния спектральная интенсивность компонент дублета на частоте  $\omega$ , отсчитываемой от частоты падающего света, имеет вид [85]

$$I_B(\omega) = \frac{I_0 V R_{sc}(\rho)}{2\pi r^2} e^{-\sigma l} \left[ \frac{\Gamma_{BD}}{(\omega - uq)^2 + \Gamma_{BD}^2} + \frac{\Gamma_{BD}}{(\omega + uq)^2 + \Gamma_{BD}^2} \right] \quad (3.1),$$

где  $I_0$  – интенсивность падающего света,  $V$  – рассеивающий объем,  $R_{sc}(\rho)$  – константа рассеяния на адиабатических флуктуациях плотности,  $r$  – расстояние от рассеивающего объема до точки наблюдения,  $\sigma$  – коэффициент экстинкции,  $l$  – путь, проходимый светом в среде,  $\Gamma_{BD} = q^2(4\eta/3 + \zeta)/(2\rho)$ ,  $\eta$  and  $\zeta$ , – коэффициенты сдвиговой и объемной вязкости,  $\rho$  – плотность. Скорость звука и коэффициенты вязкости определены на частоте дублета.

Интенсивность центральной компоненты в исследуемой системе определяется, главным образом рассеянием на флуктуациях параметра порядка, связанный в данной суспензии с переходом типа золь-гель. Константа рассеяния на этих флуктуациях имеет вид

$$R_{sc}(\psi) = \frac{\pi^2}{\lambda^4} \left( \frac{\partial \varepsilon}{\partial \psi} \right)^2 \langle |\delta \psi|^2 \rangle \quad (3.2),$$

где  $\delta \psi$  - флуктуации параметра порядка, ответственного за фазовый переход.

В критической области

$$\langle |\delta \psi|^2 \rangle \sim \left( \frac{|T - T_c|}{T_c} \right)^{-\gamma} \equiv \tau^{-\gamma} \quad (3.3),$$

где  $T_c$  - критическая температура,  $\gamma$  - критический индекс восприимчивости.

Это приводит к резкому возрастанию интенсивности центральной компоненты [3,4] и увеличению потерь света на рассеяние, т.е. к росту коэффициента экстинкции  $\sigma$ . Явное выражение для коэффициента экстинкции с использованием приближения Орнштейна-Цернике имеет вид [86]

$$\sigma = \pi R_{sc}(\psi) \left[ \frac{2\alpha^2 + 2\alpha + 1}{\alpha^3} \ln(1 + 2\alpha) - 2 \frac{1 + \alpha}{\alpha^2} \right] \quad (3.4),$$

$\alpha = 2 (k r_c)^2$ ,  $k = 2 \pi n / \lambda$ ,  $r_c = r_0 \tau^{-\nu}$  - радиус корреляции,  $\nu$  - критический индекс.

Вдали от окрестности критической точки  $kr_c \ll 1$ , коэффициент экстинкции приближенно имеет вид

$$\sigma = \frac{8\pi}{3} R_{sc}(\psi) \sim \tau^{-\gamma} \quad (3.5)$$

Так как константа рассеяния от адиабатических флуктуаций плотности меняется слабо, то интегральная интенсивность компонент дублета в критической области может уменьшаться в соответствии с потерями на рассеянии на флуктуациях параметра порядка. Это имеет силу как для луча в

кювете, приходящего от источника к рассеивающей области, так и рассеянных лучей, распространяющихся по направлению к точке наблюдения. Таким образом, интенсивности компонент МБ дублета должны убывать как

$$I_B \propto \exp \left[ \frac{8\pi}{3} R_{sc}(\psi) l \right] \quad (3.6),$$

Мы проанализировали поведение этих компонент, полагая, что  $\gamma \sim 1$ . Результат анализа показан на Рис. 3.4 с помощью сплошной линии. Хорошо видно, что температурная зависимость интенсивности МБ дублета в растворе лизоцима в области ниже критической температуры описывается в рамках предложенного механизма. Полный путь, пройденный падающим и рассеянным светом в кювете был порядка 1 см. Максимально достигнутое значение коэффициента экстинкции оказалось порядка  $1.3 \text{ cm}^{-1}$  для лизоцима, находящегося в нейтральном буфере. Такое большое значение коэффициента экстинкции качественно согласуется с поведением системы, которая в этой области температур сильно опалесцирует. Значения подгоночных параметров для лизоцима, находящегося в кислой и нейтральной среде, выведенного в степень экспоненты отличается друг от друга приблизительно в два раза (Рис.3.4). Такое различие обусловлено, по-видимому, механизмами образования агрегатов макромолекул. Падение величины интенсивности компонент МБР находит соответствие с поведением скорости гиперзвука, которое описывалось выше.

В заключении подведем итоги, процесс денатурации лизоцима различен в растворах с различной кислотностью. Лизоцим в NaAc буфере (кислой среде) показывает большую стабильности при изменении температуры и при температурной эволюции проходит последовательно через состояние с промежуточной ("расплавленной глобулы") фазой (333-346 К), агрегирование и дальнейший переход в гелеподобную фазу при 343 К. В наших эксперимента было показано отсутствие промежуточной фазы в лизоциме, находящемся в нейтральной среде, что, как мы полагаем, связано с более

компактной структурой и увеличением гидрофобных взаимодействий. Это согласуется с литературными данными [87]. Лизоцим в нейтральной среде денатурирует и одновременно начинает агрегировать, начиная с температур 330 К, переходя в гелеподобное состояние в окрестности 343 К. Это отличается от динамики фазовых превращений лизоцима в кислой среде, в том числе и температурой перехода в гелеподобную фазу ( $T \sim 347$  К).

### **3.2 Низкочастотная динамика БСА в дейтерированном PBS буфере.**

На сегодняшний день тяжелая вода активно используется как растворитель для белков в ряде экспериментальных техник, таких как инфракрасная и нейтронная спектроскопия, ЯМР. В этих экспериментах может  $H_2O$  служить помехой при получении полезного сигнала от белков. Вода представляет собой естественную среду для белков и влияет на все их свойства и функции. Она является как необходимой составляющей для их биологической активности так и компонентом, обеспечивающим стабильность белковых глобул, в частности именно гидрофобные взаимодействия участвуют в самосборке белковой глобулы. Известно что, растворители  $D_2O$  и  $H_2O$  различаются по свойствам, в частности дейтерирование увеличивает (ослабляет) длину водородной связи и уменьшают (усиливают) длину ОН связи [88]. Различия в гидрофобных эффектах в  $D_2O$  и в  $H_2O$ , вытекают в структурные и динамические различия между белками, растворенными в различных растворителях, например, в экспериментах по МНР наблюдалось уменьшение радиуса гирации в результате замены дистиллированной воды на тяжелую воду [89]. Уменьшение радиуса гирации следует из следующих соображений: дейтерирование сопровождается ослаблением сольватации гидрофобных (неполярных) групп и как следствие вызывает усиление воздействия растворителя на гидрофобные группы. В ряде работ обсуждается изменение стабильности белков при изотопном обмене [90,91]. На основании экспериментов по неупругому рассеянию нейтронов [92] и люминисценции

[93] можно заключить вывод об уменьшении гибкости молекулы белка в растворе содержащим тяжелую воду. Измерение свободной энергии Гиббса переноса неполярных аминокислот из  $\text{H}_2\text{O}$  в  $\text{D}_2\text{O}$  также приводит к выводу об увеличении стабильности белков в растворителях содержащих тяжелую воду [94].

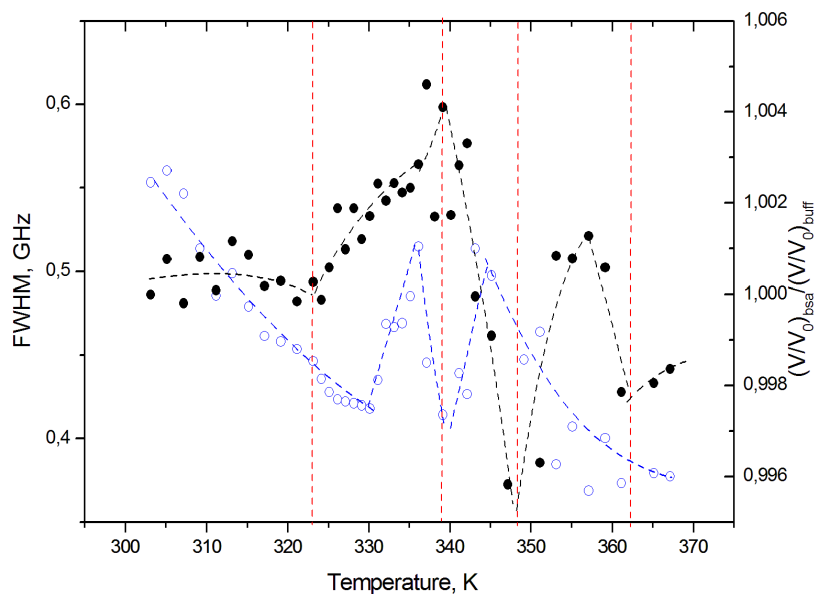
Низкочастотная динамика БСА при замене протонированного буфера на дейтерированный должна меняться, вслед за изменениями в динамике фазовых превращений. Это мотивировало нас к проведению исследований динамики БСА в дейтерированном буфере и дальнейшем сопоставлении наших результатов с данными комплиментарных исследований.

В рамках исследования изотопического эффекта в динамике фазовых превращений в БСА были проведены эксперименты по МБР света в растворах на тяжелой воде с концентрацией белка 100 мг/мл. Раствором служил натрий-фосфатный буфер приготовленный на  $\text{D}_2\text{O}$  (рН=7,45). По результатам этих исследований были построены температурные зависимости сдвига частоты, полуширины и интенсивности дублета МБР света, интенсивности рэлеевской компоненты в растворах БСА. Результаты представлены на рисунках 3.5-3.7 и включают в себе четыре графика. Для удобства интерпретации были проведены пунктирные линии, которые не являются теоретическими расчетами.

Анализ температурного поведения сдвига частоты в растворе БСА проводился согласно процедуре, описанной в предыдущем параграфе. Результаты нормировки на значение сдвига частоты в буфере представлены на рисунке 3.5.

Сопоставляя полученные результаты эксперимента по низкочастотной динамике можно выделить 5 условных температурных областей, границы которых отмечены на графиках красными пунктирными линиями. Первая область (I): 298 К – 323 К, вторая (II): 323 К – 338 К, третья (III): 338 К – 347

К, четвертая (IV): 347 К – 363 К, пятая (V): выше 363 К. Эти пять областей отражают молекулярную динамику белка при изменении температуры. Остановимся на каждом из участков подробнее.



*Рисунок 3.5 Черные точки: нормированная на буфер температурная зависимость величины сдвига компонент МБ в растворах БСА, синие точки: Температурная зависимость относительного изменения полуширины на полувысоте компонент МБ в растворах БСА*



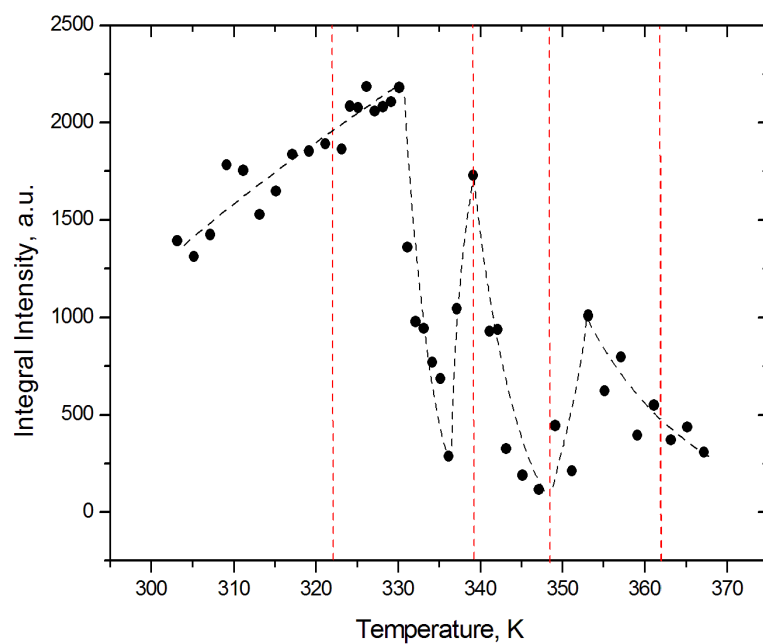


Рисунок 3.6. Температурная Зависимость интенсивности компонент для раствора БСА

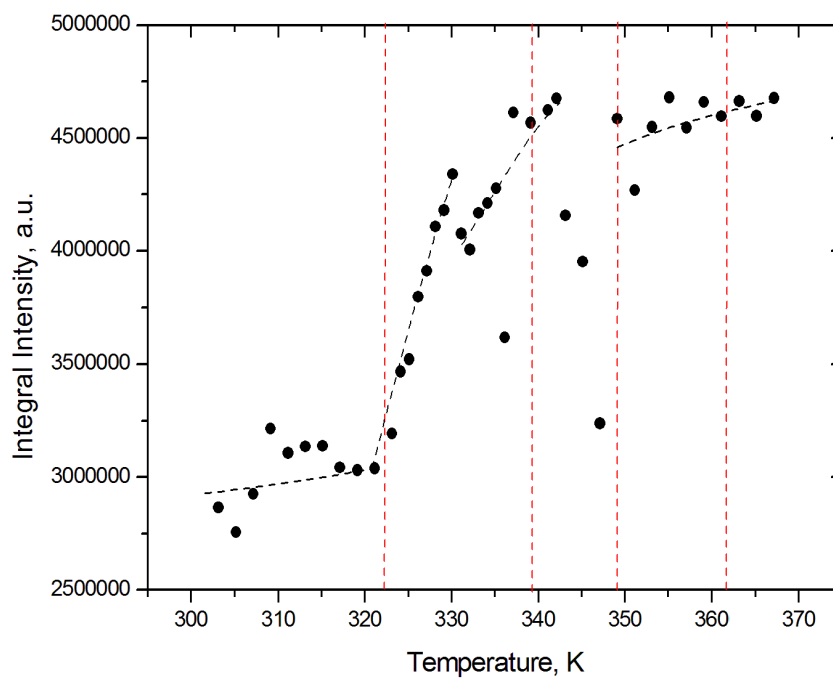


Рисунок 3.7. Температурная зависимость интенсивности рэлеевских компонент для растворов БСА

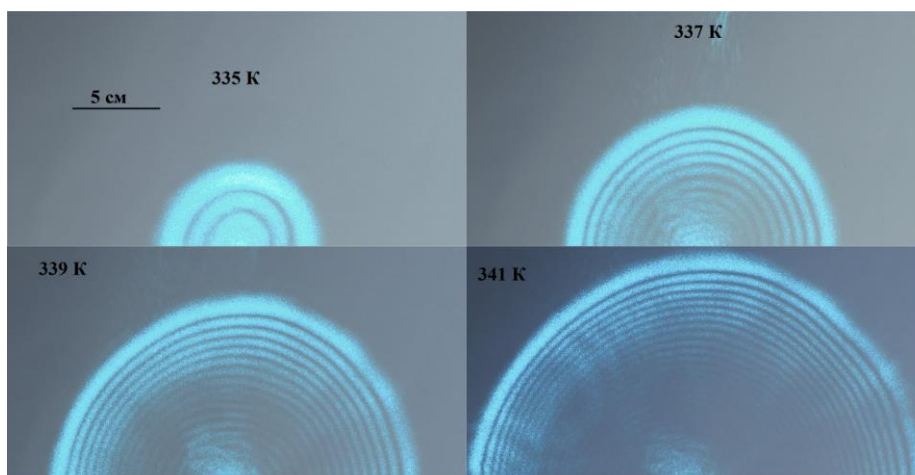
В первой области во всех четырех зависимостях (рис. 3.5-3.7) аномальное (отличное от буфера) поведение не наблюдается: скорость гиперзвука и интенсивность рэлеевской компоненты в этой области можно считать постоянными в пределах погрешности, зависимость полуширины на полувысоте компоненты МБР или затухание монотонно убывает, что соответствует увеличению значения интенсивности компонент МБ. В этой области макромолекула находится в нативном состоянии, и повышение температуры сопровождается увеличением внутренней энергии раствора.

Первые структурные изменения появляются во второй температурной области 323 К – 338 К. В этом температурном диапазоне наблюдается резкое увеличение значения интегральной интенсивности рэлеевской компоненты, и рост нормированного значения скорости звука для обоих растворов. В поведении интенсивности рэлеевской компоненты наблюдается скачок. Поведение интенсивности компонент МБ в БСА испытывает аномальное поведение, аналогичное поведению в лизоциме: в окрестности температуры 330 К зависимость интенсивности компонент МБ сменяет возрастание на убывание для обоих растворов, что свидетельствует о начале образования новых более крупных структур. В поведении затухания наблюдается аномалия в диапазоне температур 330 К – 338 К в зависимости присутствует максимум в окрестности 334 К. Исследования по неупругому рассеянию нейтронов отмечают, что выше температуры 330 К появляются структурные изменения и наблюдается увеличение мобильности боковых групп [95]. После температуры 330 К домены, из которых состоит молекула БСА начинают активно разворачиваться. Мы полагаем, что данный процесс сопровождается образованием агрегатов. Скачок в зависимости интенсивности рэлеевской компоненты может быть объяснен увеличением жесткости молекулы БСА в окружении тяжелой воды, он также отражает резкую утрату третичной структуры. В данном случае D<sub>2</sub>O проявляет защитные эффекты по отношению к доменной структуре [91].

Существенным в поведении динамики дейтерированного раствора является существование максимума в зависимости затухания (рис. 3.5). Аномалия в изменении полуширины компонент дублета МБР, т.е. затухания гиперзвуковых волн, связаны с вязкостью. Аномалии затухания свидетельствуют о существовании неустойчивости системы. Поэтому можно предположить, что аномалии в окрестности 333 К связаны с денатурацией БСА. Таким образом, в данной температурной области идет два процесса, вначале утрата третичной структуры, а затем денатурация, которая сопровождается образованием агрегатов, после 334 К начинается золь-гель переход.

В температурной области 338 К – 347 К наблюдается падение значений скоростей звука для. Похожее поведение скорости звука наблюдалось при изучении тепловой денатурации лизоцима, которое соответствовало образованию крупных агрегатов. Уменьшение значений скорости при увеличении температуры сопровождается так и падением интенсивности компонент МБ. Зависимость интенсивности рэлеевских компонент убывает, это может быть связано с поведением квазиупругой компоненты входящей в её состав, значение интенсивностей компонент МБ – увеличивается. Для уточнения механизмов, связанных с аномальным поведением интенсивности рэлеевской компоненты мы исследовали упругое рассеяние света, прошедшего через кювету с раствором в геометрии "вперед". Было обнаружено, что в области температур 338 К – 347 К на экране после кюветы с образцом появляются концентрические кольца, связанные с дифракцией прошедшего через образец лазерного луча (рисунок 3.8). Картина на экране в виде концентрических колец позволяет предполагать, что наблюдается дифракция света на сфере, причем размеры образующихся агрегатов одинаковы и сопоставимы с длиной волны и составляют 60 мкм. Одной из причин возникновения таких агрегатов может служить увеличение влияния белок-раствор взаимодействий в дейтерированном состоянии и уменьшении

белок-белок взаимодействий. Мы предполагаем, что образование агрегатов в большей степени идет за счет гидрофобных взаимодействий, которые стремятся развернуть молекулы с открытыми активными центрами друг к другу, образуя агрегаты подобные мицеллам.



*Рис.3.8: Дифракционная картина, наблюдаемая на экране при прохождении лазерного луча через кювету с раствором БСА с концентрацией 100 мг/мл при денатурации.*

В начале четверной температурной области 347 К – 363 К, концентрические кольца пропадают. Интенсивность рэлеевской компоненты в этой области не зависит от температуры. Интенсивность компонент МБ убывает начиная с температуры 352 К. В зависимости скорости звука появляется скачок в окрестности температуры 352 К, свидетельствующий о резком изменении структуры в растворе. При увеличении температуры выше 352 К в зависимости скорости звука наблюдается аномалия с минимумом в окрестности температуры 363 К. В зависимости затухания для раствора белка лизоцима в экспериментах по низкочастотной динамике присутствует максимум, связанный с окончанием перехода системы в гель[2,3], для БСА в окружении тяжелой воды такой максимум в зависимости затухания отсутствует. Такие существенные различия в поведении скорости звука вытекают из-за различных механизмов образования геля. Гель в лизоциме образуется путем постепенного увеличения межмолекулярных

взаимодействий и с увеличением температуры продолжает увеличивать размеры агрегатов. К температуре 363 К гель полностью сформировался с образование новой, плотной структуры, это отражается максимумом в значении затухания и минимумом в скорости. Другой механизм прослеживается для дейтерированного БСА: как уже говорилось выше, к температуре 347 К пропадает дифракционная картина, причиной этому может служить скачкообразное “разваливание” агрегатов до нерегулярных структур, внутренняя энергия агрегатов увеличивается настолько, что гидрофобные силы не способны больше удерживать агрегаты вместе. После образования большого числа неупорядоченных структур также начинает образовываться гель.

## Заключение

Проведенные исследования низкочастотной динамики лизоцима и дейтерированного БСА показали, что:

1. Последовательность фазовых превращений в лизоциме зависит от кислотности раствора, в котором он находится. В кислой среде ( $pH = 4.6$ ) при повышении температуры от комнатной денатурация проходит через промежуточную фазу (состояние "расплавленной" глобулы). Дальнейшее повышение температуры приводит к агрегации макромолекул и затем, образованию гелеподобной фазы. Для растворов с нейтральной средой ( $pH = 7.45$ ) в лизоциме реализуется другая последовательность фазовых превращений: в предпереходной области температур отсутствует промежуточная фаза и денатурация сопровождается образованием агрегатов с дальнейшим переходом в гелеподобную фазу.

2. Анализ данных по поведению интенсивности мандельштам-бриллюэновского дублета в окрестности денатурации ( $T_d$ ) лизоцима показал, что температурная зависимость интенсивности выше  $T_d$  хорошо описывается в рамках теории многократного рассеяния света в опалесцирующей среде. Коэффициенты экстинкции (равно как и показатели степени в используемых для расчетов выражениях), полученные в ходе аппроксимации температурных зависимостей интенсивности компонент МБ для растворов с различной кислотностью отличается в два раза. Это связывается нами с различным механизмом образования агрегатов при денатурации лизоцима.

3. Последовательность фазовых превращений в дейтерированном БСА при повышении температуры состоит из фазы, предшествующей (промежуточной) денатурации, собственно денатурации белка, этап формирования агрегатов, преобразующихся уже в гелеподобную фазу. В промежуточной фазе мы предполагаем утрату белком третичной структуры. В процессе агрегирования возникают в области температур от 337 до 347 К

возникают агрегаты размером около 60 мкм, на которых наблюдается дифракция света.

3. В работе было показано, что усложнение структуры белка (от однодоменного в лизоциме, до трехдоменного - в БСА) при сопоставимых условиях рассеяния поведение скорости, затухания гиперзвука в окрестности денатурации различно. Это видимо, связано с тем, что механизмы изменения пространственной структуры при денатурации белка различны, что и проявляется в спектрах рассеяния МБР.

## **Благодарности**

Автор выражает благодарность сотрудникам лаборатории сегнетоэлектричества и магнетизма ФТИ им А. Ф. Иоффе РАН, кафедре молекулярной биофизики и физики полимеров СПбГУ.

Работа была частично выполнена при поддержке гранта РФФИ №15-02-05770.



## Список литературы

1. V E Vashchenkov *et al* 2014 *J. Phys.: Conf. Ser.* 572 012015
2. Svanidze A V, Lushnikov S G and Seiji Kojima 2009 *JETP Lett.* 90 80
3. Svanidze A V, Lushnikov S G, Romanov V P 2011 *JETP Lett.* 93 409
4. A. Asenbaum, C. Pruner, H. W. Schröer, K. Plätzer, L. Bieler, H. Brandstetter, W. Schirmacher, S. Schulte, E. Wilhelm, *J. Mol. Liquids* 2011, 158, 7.
5. S. G. Lushnikov, A. V. Dmitriev, A. I. Fedoseev, G. A. Zakharov, A. V. Zhuravlev, A. V. Medvedeva, B. F. Schegolev, E. V. Savvateeva-Popova, “Low-frequency dynamics of DNA in Brillouin light scattering spectra”, *JETP Lett*, 98:11 (2013), 830–836
6. Murzin A. G., et al., *J. Mol. Biol.* 247, (1995) 536
7. Orengo, C.A., et al., *Structure.* 5 (1997) 1093
8. Pauling, L. & Corey, R. B. Atomic Coordinates and Structure Factors for Two Helical Configurations of Polypeptide Chains. *PNAS*, 37, 235-240, (1951). |
9. Pauling, L. & Corey, R. B. The Structure of Synthetic Polypeptides. *PNAS*, 37, 241-250, (1951).
10. Pauling, L. & Corey, R. B. The Pleated Sheet, A New Layer Configuration of Polypeptide Chains. *PNAS*, 37, 251-256, (1951).
11. Pauling, L. & Corey, R. B. The Structure of Feather Rachis Keratin. *PNAS*, 37, 256-261, (1951).|
12. Pauling, L. & Corey, R. B. The Structure of Hair, Muscle, and Related Proteins. *PNAS*, 37, 261-271, (1951).|
13. Pauling, L. & Corey, R. B. The Structure of Fibrous Proteins of the Collagen-Gelatin Group. *PNAS*, 37, 272-281, (1951).|
14. Pauling, L. & Corey, R. B. The Polypeptide-Chain Configuration in Hemoglobin and Other Globular Proteins. *PNAS*, 37, 282-285, (1951).

15. Pauling, L., Corey, R. B., & Branson, H. R. The Structure of Proteins: Two Hydrogen-Bonded Helical Configurations of the Polypeptide Chain. PNAS, 37, 235-240, (1951).
16. Pauling, L. & Corey, R. B. Two Hydrogen-Bonded Spiral Configurations of the Polypeptide Chain. J. Am. Chem. Soc. 72, 5349, (1950)
17. Anfinsen CB (1973). "Principles that govern the folding of protein chains". Science 181 (4096): 223–230.
18. Птицын ОБ, Финкельштейн АВ Связь вторичной структуры глобулярных белков с их первичной структурой // *Биофизика*.- 1970.- Т. 15, № 5.- С. 757-768.
19. Птицын ОБ, Финкельштейн АВ Предсказание спиральных участков глобулярных белков по их первичной структуре // *Докл. АН СССР*.- 1970.- Т. 195, № 1.- С. 221-224.
20. Птицын ОБ, Финкельштейн АВ Механизм самоорганизации третичной структуры глобулярных белков // *Биоорганич. химия*.- 1978.- Т. 4, № 3.- С. 349-353.
21. Птицын ОБ, Финкельштейн АВ Сворачивание и топология параллельной бета-структуры // *Биофизика*.- 1979.- Т. 24, № 1.- С. 27-31.
22. Птицын ОБ, Финкельштейн АВ Проблема предсказания структуры белка // *Итоги науки и техники. Сер. "Молекулярная биология"*.- Москва: ВИНТИ.- 1979.- Т. 15.- С. 6-41.
23. Птицын ОБ, Финкельштейн АВ Направленный механизм самоорганизации белков: обобщенная модель // *Кристаллография*.- 1981.- Т. 26, № 5.- С. 1066-1073.
24. Птицын ОБ, Финкельштейн АВ, Добсон КМ Самоорганизация белковых структур - мост между физикой и биологией // *Молекуляр. биология*.- 1999.- Т. 33, № 6.- С. 1012-1015.
25. Птицын ОБ, Финкельштейн АВ, Мурзин АГ Предсказание пространственной структуры альфа- и бета- интерферонов // *Молекуляр. биология*.- 1986.- Т. 20, № 1.- С. 21-28.]

26. Kimura, M. Evolutionary rate at the molecular level // *Nature*. — 1968. — Т. 217. — С. 624-626.
27. Б.К. Вайнштейн. Современная кристаллография. Том 2: Симметрия кристаллов. Методы структурной кристаллографии. М: Наука. - 1979. — С. 360.
28. Stuhrmann H.B. and Fuess H. A neutron small-angle scattering study of hen egg-white lysozyme // *Acta Cryst.* — 1976. — A32. — P. 67-73.
29. Giordano R., Grasso A., Teixeira J. Small-angle neutron scattering in lysozyme solution // *Phys. Rev. A.* — 1991. — V. 43. — № 12. — P. 6894-6899.
30. Stradner A., Thurston G.M., Schurtenberger P. Tuning short-range attractions in protein solutions: from attractive glasses to equilibrium clusters // *J. Phys.: Condens. Matter.* — 2005. — V. 17. — P. S2805-S2816.
31. Stradner A., Sedgwick H., Cardinaux F. et al. Equilibrium cluster formation in concentrated protein solutions and colloids // *Letters to nature.* — 2004. — V. 432. — P. 492-494.
32. Seth E. and Aswal V.K. Small-angle scattering study of macromolecular aggregation in aqueous lysozyme solution // *J. Macromol. Sci. - Physics.* — 2002. — V. B42. — № 1. — P. 77-83.
33. Chodankar S. and Aswal V.K. Structure and interaction in protein solutions as studied by small-angle neutron scattering // *Phys. Rev. E.* — 2005. — V. 72. — P. 041931.
34. Niimura N., Minezaki Y., Tanaka I., Fujiwara S., Ataka M. Polar structure of lysozyme aggregates in unsaturated solution determined by small-angle neutron scattering – contrast variation method // *Journal of Crystal Growth.* — 1999. — V. 200. — P. 265-270.
35. Renard D., Boue F., Lefebvre J. “Ordered” structure in solutions and gels of a globular protein as studied by small angle neutron scattering // *Biopolymers.* — 1996. — V. 39. — P. 149-159.

36. Chen L., Hodgson K.O., Doniach S. A lysozyme folding intermediate revealed by solution X-ray scattering // J. Mol. Biol. – 1996. – V. 261. – P. 658-671.
37. Petrescu A-J., Receveur V., Calmettes P., Durand D., Desmadril M., Roux B., Smith J.C. Small-angle neutron scattering by a strongly denatured protein: analysis using random polymer theory // Biophys. J. – 1997. – V. 72. – P. 335-342.
38. Petrescu A-J., Receveur V., Calmettes P., Durand D., Smith J.C. Excluded volume in the configurational distribution of a strongly-denatured protein // Protein Science. – 1998. – V. 7. – P. 1396-1403.
39. Laires D., Pauthe E. and Pelta J. Refolding of a high molecular weight protein: salt effect on collapse // Biophys. J. - 2003. - V. 84. - p. 3904 - 3916.
40. Opella S.J. Solid state NMR of biological systems. // Ann. Rev. Phys. Chem. 1982. V.33. P. 533-562.
41. Tycko R. Biomolecular solid state NMR: advances in structural methodology and applications to peptide and protein fibrils. // Ann. Rev. Phys. Chem. 2001. V. 52. P. 575-606.
42. Schwartz S. D. Dynamics in Enzyme Catalysis. – Springer Berlin Heidelberg, 2013. – C. 189
43. Bialek W., Onuchic J. N. PNAS 85 (1988) 5908
44. Maguid S., et al., Gene 422 (2008) 7
45. Lu C. H. et al. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. 72 (2008) 625; Ming D. et al. PNAS, 99 (2002) 8620
46. Ptitsyn O.B., Advances in Protein Chemistry 1995 47 83
47. Clark A.H., Kavanagh G.M., Ross-Murphy S.B., Food Hydrocolloids 2001 15 383
48. Pfeil W., Privalov P.L., Biophysical Chemistry 1976 4 23
49. Brown J.R., Federation Proceedings 1975 34 591
50. Kragh-Hansen U., Pharmacological Reviews 1981 33(1) 17
51. Brown J.R., Federation Proceedings 1976 35 2141

52. Oberg K.A., Uversky V.N., Protein and Peptide Letters 2001 8(4) 297
53. Lin V.J.C., Koenig J.L., Biopolymers 1976 15 203
54. Yuan B., Murayama K., Wu Y. et.al., Applied Spectroscopy 2003 57(10) 1223
55. Michnik A., Michalic K., Kluczevska A. et.al., Journal of Thermal Analysis and Calorimetry 2006 84(1) 113
56. Honda C., Kamizono H., Samejima T. et.al., Chemical and Pharmaceutical Bulletin 2000 48(4) 464
57. Harmsen B.J., Braam W.J., International Journal of Protein Research 1969 1 225
58. Chodankar S., Aswal V.K., Kohlbrecher J. et.al., Physical Review E 2009 79 021912
59. Clark A.H., Saunderson D.H.P., Suggett A., International Journal of Peptide and Protein Research 1981 17 353
60. Fleury P.A., Lyons K.B. - North-Holland: Amsterdam. – 1983 430 P.
61. Doster W., Cusack S., Petry W. Dynamical transition of myoglobin revealed by inelastic neutron scattering // Nature. – 1989. – V. 337. – P. 754-756.
62. Kataoka M., Kamikubo H., Yunoki J., Tokunaga F., Kanaya T., Izumi Y., Shibata K. Low energy dynamics of globular proteins studied by inelastic neutron scattering // Journal of Physics and Chemistry of Solids. – 1999. – V. 60. – P. 1285-1289.
63. Perez J., Zanotti J.-M., Durand D. Evolution of the internal dynamics of two globular proteins from dry powder to solution // Biophysical Journal. – 1999. – V. 77. – P. 454-469.
64. Roh J.H., Novikov V.N., Gegory R.B., Curtis J.E., Chowdhuri Z., Sokolov A.P. Onset of anharmonicity in protein dynamics // Phys. Rev. Lett. – 2005. – V. 95. – P. 038101-1-4.
65. Jacob J., Krafft C., Welfle K., Welfle H., Saenger W. Melting points of lysozyme and ribonuclease A crystals correlated with protein unfolding: a Raman spectroscopy study // Acta Cryst. – 1998. – V. D54. – P.74-80.

66. Leyser H., Doster W., Diehl M. Far-infrared emission by boson peak vibrations in a globular protein // *Phys. Rev. Lett.* – 1999. – V. 82. – № 14. – P. 2987-2990.
67. Urabe H., Sugawara Yo., Ataka M., Rupprecht A. Low-frequency Raman spectra of lysozyme crystals and oriented DNA films: dynamics of crystal water // *Biophysical Journal.* – 1998. – V. 74. – P. 1533-1540.
68. Galiskan G., Kisliuk A., Tsai A.M., Soles C.L., Sokolov A.P. Protein dynamics in viscous solvents // *Journal of Chemical Physics.* – 2003. – V. 118. – № 9. – P. 4230-4236.
69. Perez J., Zanotti J.-M., Durand D. Evolution of the internal dynamics of two globular proteins from dry power to solution // *Biophysical Journal.* – 1999. – V. 77. – P. 454-469.
70. Giraud G., Karolin J., Wynne K. Low-frequency modes of peptides and globular proteins in solution observed by ultrafast OHD-RIKES spectroscopy // *Biophysical Journal.* – 2003. – V. 85. – P. 1903-1913.
71. Sokolov A.P., Rossler E., Kisliuk A., Quitmann D. Dynamics of strong and fragile glass formers: Differences and correlation with low-temperature properties // *Phys. Rev. Lett.* – 1993. – V. 71. – P. 2062-2065.
72. Das S.P. Model of defect diffusion and development of the boson peak in an amorphous solids // *Phys. Rev. E.* – 1999. – V. 59. – P. 3870-3875.
73. Roh J.H., Novikov V.N., Gegory R.B., Curtis J.E., Chowdhuri Z., Sokolov A.P. Onset of anharmonicity in protein dynamics // *Phys. Rev. Lett.* – 2005. – V. 95. – P. 038101-1-4.
74. R. Bizzarri, A. Paciaroni, C. Arcangeli, S. Cannistraro, *Eur. Biophys. Eur. Biophys. J.* 30, 443 (2001).
75. С.Г. Лушников, А.В. Сванидзе, И.Л. Сашин. Письма в ЖЭТФ 82, 31 (2005); С.Г. Лушников, А.В. Сванидзе, И.Л. Сашин, С.Н. Гвасалия *Кристаллография* 52(5), 866 (2005).
76. G. Caliskan, A. Kisliuk, A. M. Tsai, C. L. Soles, A. P. Sokolov. *J. Chem. Phys.* 118, 4230 (2003).

77. Hisako Urabe, Yoko Sugawara, Mitsuo Ataka and Allan Rupprecht.  
Biophys. J. 74, 1533 (1998).
78. Tsuneyoshi Nakayama and Kousuke Yakubo, Raymond L. Orbach. Rev.  
Mod. Phys. 66, 381 (1994).
79. A.B. Kudryavtsev, S.B. Mirov, L.J. DeLusas, C. Nicolette, M. van der  
Woerd, T.L. Bray and T.T. Basiev. Acta Cryst. D54, 1216 (1998).
80. Jacob J., Krafft C., Welfle K., Welfle H., Saenger W. Melting points of  
lysozyme and ribonuclease A crystals correlated with protein unfolding: a  
Raman spectroscopy study // Acta Cryst. – 1998. – V. D54. – P.74-80.
81. Vaughan J.M. The Fabry-Perot Interferometer: IOP Publishing Ltd – 1989  
583 P.
82. Физическая акустика. Под редакцией У. Мезона и Р. Тезстона, пер. с  
английского. М.: Мир. – 1973 432 С.
83. Sathyadevi Venkataramani, Jeremy Truntzer, and Denis R. Coleman  
Thermal stability of high concentration lysozyme across varying pH: A Fourier  
Transform Infrared study J Pharm Bioallied Sci; 5(2): 148–153. (2013)
84. A. Bonincontro et al. : Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 12 (1998) 1–5
85. L. A. Zubkov and V. P. Romanov, Usp. Fiz. Nauk 14, 615 (1987).
86. V. G. Puglieli and N. C. Ford, Phys. Rev. Lett. 25, 143 (1970).
87. A. Bonincontro, G. Risuleo / Spectrochimica Acta Part A 59 (2003) 2677
88. Steiner, T. Angew Chem Int Ed 2002, 241, 48-76
89. Svergun D.I., Richards S., Koch M.H.J., Sayers Z., Kuprin S., Zaccai G.,  
Proc Natl Acad Sci USA, 74, 117-125 (1998)
90. Efimova, Y. M., Haemers, S., Wierczinski, B., Norde, W. and Well, A. A.  
v. (2007), Stability of globular proteins in H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O. Biopolymers,  
85: 264–273. doi: 10.1002/bip.20645
91. Ling Fu, Sandrine Villette, Stéphane Petoud, Felix Fernandez-Alonso  
and Marie-Louise Saboungi *J. Phys. Chem. B*, 115 (8), pp 1881–1888(2011)

92. Tehei, M.; Madern, D.; Pfister, C.; Zaccai, G. Proc Natl Acad Sci USA 2001, 98, 14356–14361.
93. Cioni, P.; Strambini, G. B. Biophys J 2002, 83, 3246–3253.
94. Kresheck, G. C.; Schneider, H.; Scheraga, H. A. J Phys Chem 1965, 69, 3132–3144.
95. Marco Grimaldo, Felix Roosen-Runge, Marcus Hennig, Fabio Zanini, Fajun hang, Niina Jalarvo, de Michaela Zamponi, Frank Schreiberb and Tilo Seydel Phys.Chem.Chem.Phys., 2015, 17, 4645